

(19)日本国特許庁 (JP)

## (12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平9-504174

(43)公表日 平成9年(1997)4月28日

(51)Int.Cl. <sup>*</sup>	識別記号	序内整理番号	F I	
C 12 P 21/02	Z N A	9637-4B	C 12 P 21/02	ZNAC
A 61 K 38/00	A C B	9356-4H	C 07 K 14/47	
38/46	A D U	9356-4H		19/00
38/55	A B E	9152-4B	C 12 N 9/96	
C 07 K 14/47		9152-4B		9/99

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全113頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平7-512667
(86) (22)出願日	平成6年(1994)10月28日
(85)翻訳文提出日	平成8年(1996)4月30日
(86)国際出願番号	PCT/US94/11624
(87)国際公開番号	WO95/11987
(87)国際公開日	平成7年(1995)5月4日
(31)優先権主張番号	08/144,758
(32)優先日	1993年10月29日
(33)優先権主張国	米国(US)

(71)出願人	インサイト ファーマシューティカルズ, インク.
	アメリカ合衆国 カリフォルニア州 パロ アルト ポーター ドライブ 3174
(72)発明者	スコット ランディー ダブリュー.
	アメリカ合衆国 カリフォルニア州 マウ ンテン ビュー サンモア 13140
(72)発明者	ブラックストン スコット エム.
	アメリカ合衆国 カリフォルニア州 パシ フィカ ファスター アベニュー 947
(74)代理人	弁理士 清水 初志

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 プロテアーゼネキシン1変異体を含むキメラ蛋白

## (57)【要約】

本明細書において変異体として示されるキメラ蛋白、およびこのような蛋白質を製造して、処方し、利用する方法が開示される。変異体の異なった5つの一般型が開示される。

## 【特許請求の範囲】

1. プロテアーゼネキシンー1の変異体であって、P4、P3、P2、P1、P1'、P2'、P3'、P4'よりなる群から選ばれる位置のアミノ酸残基が、その位置に天然に存在するアミノ酸残基とは異なる天然アミノ酸残基で置換されている変異体。
2. 変異体が、プロテアーゼネキシンー1と比較して異なるプロテアーゼ特異性を、および／または特定のプロテアーゼについてプロテアーゼネキシンー1と比較して上昇した率の会合定数を有する、請求の範囲1記載のプロテアーゼネキシンー1の変異体。
3. プロテアーゼネキシンー1の変異体であって、プロテアーゼネキシンー1の活性部位アミノ酸残基が、プロテアーゼネキシンー1以外のセリンプロテアーゼ阻害剤の同数の活性部位アミノ酸残基で置換されている変異体。
4. セリンプロテアーゼ阻害剤が、抗トロンビンIII、ヘパリン補因子II、 $\alpha$ -1抗トリプシン、 $\alpha$ -1プロテアーゼ阻害剤、プラスミノーゲン活性化因子阻害剤I、IIおよびIII、 $\alpha$ -2抗プラスミン、カリクレイン結合タンパク質ならびにC1阻害剤よりなる群から選ばれる、請求の範囲3記載の変異体。
5. プロテアーゼネキシンー1の活性部位のP4、P3、P2、P1、P1'、P2'、P3'、P4'位のアミノ酸残基が、下記：

E <sub>4</sub>	E <sub>3</sub>	E <sub>2</sub>	E <sub>1</sub>	E <sub>1'</sub>	E <sub>2'</sub>	E <sub>3'</sub>	E <sub>4'</sub>
Val-	Ser-	Ala-	Arg	Met-	Ala-	Pro-	Glu
Mett-	Thr-	Gly-	Arg	Thr-	Gly-	His-	Gly
Phe-	Thr-	Phe-	Arg	Ser-	Ala-	Arg-	Leu
Ile-	Ala-	Gly-	Arg	Ser-	Leu-	Asn-	Pro

Ala- Met- Ser- Arg Met- Ser- Leu- Ser  
 Ser- Val- Ala- Arg Thr- Leu- Leu- Val  
 Ile- Leu- Ser- Arg Arg- Thr- Ser- Leu  
 Phe- Arg- Ile- Leu Ser- Arg- Arg- Thr  
 Ala- Ile- Pro- Met Ser- Ile- Pro- Pro  
 Glu- Lys- Ala- Trp Ser- Lys- Tyr- Gln  
 Leu- Leu- Ser- Ala Leu- Val- Glu- Thr  
 Ile- Thr- Leu- Leu Ser- Ala- Leu- Val  
 Phe- Met- Pro- Leu Ser- Thr- Glu- Val  
 Met- Thr- Gly- Arg Thr- Gly- His- Gly.

よりなる群から選ばれるアミノ酸配列で置換されている請求の範囲3記載の変異体。

6. プロテアーゼネキシン-1の変異体であって、プロテアーゼネキシン-1の活性部位の3個またはそれ以上のアミノ酸残基が、与えられたプロテアーゼに特異的な基質配列を含む異なるアミノ酸残基で置換されている変異体。

7. 与えられたプロテアーゼが、エラスターーゼ、カテーテンG、C1エステラーゼ、トロンビン、カリクレイン、およびXa因子、IXa因子、Xla因子、XIIa因子、VIIIa因子、V'因子、活性化プロテインC、トリプシン、キモトリプシンとなる群から選ばれる請求の範囲6記載の変異体。

8. 少なくとも1個がシスティンである3個もしくはそれ以上のアミノ酸を含むタンパク質またはその一部であって、ポリエチレンジリコールが該システィンのチオ基に共有結合しているタンパク質またはその一部。

9. 少なくとも1システィン残基を有する天然に存在するタンパク質のアミノ酸配列を含む修飾されたタンパク質であって、該修飾が、ポリエチレンジリコールと該タンパク質のシスティン残基とを結合させることを含む修飾されたタンパク質。

10. ポリエチレンジリコールとタンパク質とを結合させる方法であって、所望のタンパク質を同定し、ポリエチレンジリコールとタンパク質とを結合させる部位を決定する段階と、

ポリエチレングリコールを該タンパク質のシステイン残基のチオ基に共有結合させ、ポリエチレングリコールと該タンパク質とを該部位で結合させる段階と、を含む方法。

11. システイン残基がタンパク質中に天然の状態で存在する請求の範囲10記載の方法。

12. 通常は存在しないシステイン残基を含むようにタンパク質を変化させ、該追加したシステイン残基にポリエチレングリコールを共有結合させる請求の範囲10記載の方法。

13. ポリエチレングリコールを結合させる部位が、タンパク質の溶媒接近可能領域内にある請求の範囲12記載の方法。

14. グリコシル化される部位でシステイン残基を有するようにタンパク質を変化させる請求の範囲12記載の方法。

15. 多数のシステイン残基を有するようにタンパク質を変化させる請求の範囲12記載の方法。

16. ポリエチレングリコールが少なくとも2個のタンパク質反応性部分を含む請求の範囲10記載の方法。

17. ポリエチレングリコールが200～10,000の分子量である請求の範囲10記載の方法。

18. 所望のタンパク質がプロテアーゼネキシン-1である請求の範囲10記載の方法。

19. 所望のタンパク質がプロテアーゼネキシン-1の変異体であって、該変異体は、P4、P3、P2、P1'、P2'、P3'およびP4'よりも群から選ばれる位置のアミノ酸残基が、その位置に天然に存在するアミノ酸残基とは異なる天然アミノ酸残基で置換されている請求の範囲10記載の方法。

20. 所望のタンパク質が、プロテアーゼネキシン-1の活性部位の少なくとも1アミノ酸残基がプロテアーゼネキシン-1以外のセリンプロテアーゼ阻害剤の

同数の活性部位アミノ酸残基で置換されている、プロテアーゼネキシン-1の変異体である請求の範囲10記載の方法。

2.1. 所望のタンパク質が、プロテアーゼネキシンー1の活性部位の3個またはそれ以上のアミノ酸残基が、与えられたプロテアーゼに特異的な基質配列を含む異なるアミノ酸残基で置換されている、プロテアーゼネキシンー1の変異体である、請求の範囲10記載の方法。

2.2. 少なくとも1システィン残基を有する天然に存在するプロテアーゼネキシンー1タンパク質のアミノ酸配列を含む、修飾されたプロテアーゼネキシンー1であるタンパク質であって、該修飾が、ポリエチレングリコールと該タンパク質のシスティン残基とを結合させることを含む修飾されたタンパク質。

2.3. プロテアーゼネキシンー1のアミノ酸配列を含む、プロテアーゼネキシンー1の修飾された変異体であって、P4、P3、P2、P1、P1'、P2'、P3'およびP4'よりなる群から選ばれる位置のアミノ酸残基が、その位置に天然に存在するアミノ酸残基とは異なる天然アミノ酸残基で置換されていて、かつ該配列は少なくとも1システィン残基を有し、該修飾が、ポリエチレングリコールと該タンパク質のシスティン残基とを結合させることを含む修飾された変異体。

2.4. 変異体が、プロテアーゼネキシンー1と比較して異なるプロテアーゼ特異性を、および/または特定のプロテアーゼについてプロテアーゼネキシンー1と比較して上昇した率の会合定数を有する、請求の範囲23記載のプロテアーゼネキシンー1の修飾された変異体タンパク質。

2.5. プロテアーゼネキシンー1の修飾された変異体であって、プロテアーゼネキシンー1の活性部位のアミノ酸残基がプロテアーゼネキシンー1以外のセリンプロテアーゼ阻害剤の同数の活性部位アミノ酸残基で置換されていて、かつ該変異体タンパク質のアミノ酸配列は少なくとも1システィン残基を有し、該修飾が、ポリエチレングリコールと該タンパク質のシスティン残基とを結合させることを含む修飾された変異体。

2.6. セリンプロテアーゼ阻害剤が、抗トロンビンIII、ヘパリン補因子II、 $\alpha$ -1プロテアーゼ阻害剤、プラスミノーゲン活性化因子阻害剤I、IIおよびIII

、

$\alpha$ -2抗プラスミン、カリクレイン結合タンパク質ならびにC1阻害剤よりなる

群から選ばれる請求の範囲25記載の修飾された変異体。

27. プロテアーゼネキシン-1の活性部位のP4、P3、P2、P1、P1'

、P2'、P3'およびP4'位のアミノ酸残基が、下記：

P <sub>4</sub>	P <sub>3</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>1</sub>	P <sub>1'</sub>	P <sub>2'</sub>	P <sub>3'</sub>	P <sub>4'</sub>
Val-	Ser-	Ala-	Arg	Met-	Ala-	Pro-	Glu
Met-	Thr-	Gly-	Arg	Thr-	Gly-	His-	Gly
Phe-	Thr-	Phe-	Arg	Ser-	Ala-	Arg-	Leu
Ile-	Ala-	Gly-	Arg	Ser-	Leu-	Asn-	Pro
Ala-	Met-	Ser-	Arg	Met-	Ser-	Leu-	Ser
Ser-	Val-	Ala-	Arg	Thr-	Leu-	Leu-	Val
Ile-	Leu-	Ser-	Arg	Arg-	Thr-	Ser-	Leu
Phe-	Arg-	Ile-	Leu	Ser-	Arg-	Arg-	Thr
Ala-	Ile-	Pro-	Met	Ser-	Ile-	Pro-	Pro
Glu-	Lys-	Ala	Trp	Ser-	Lys-	Tyr-	Gln
Leu-	Leu-	Ser-	Ala	Leu-	Val-	Glu-	Thr
Ile-	'Thr-	Leu-	Leu	Ser-	Ala-	Leu-	Val
Phe-	Met-	Pro-	Leu	Ser-	Thr-	Glu-	Val
Met-	Thr-	Gly-	Arg	Thr-	Gly-	His-	Gly

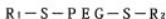
よりなる群から選ばれるアミノ酸配列で置換されていて、かつ変異体タンパク質は少なくとも1システイン残基を有し、該修飾が、ポリエチレンギリコールと該タンパク質のシステイン残基とを結合させることを含む請求の範囲25記載の修飾された変異体。

28. プロテアーゼネキシン-1の修飾された変異体であって、プロテアーゼネキシン-1の活性部位の3個またはそれ以上のアミノ酸残基が、与えられたプロテアーゼに特異的な基質配列を含む異なるアミノ酸残基で置換されていて、かつ該変異体タンパク質のアミノ酸配列は少なくとも1システイン残基を有し、該修飾が、ポリエチレンギリコールと該タンパク質のシステイン残基とを結合させることを含む修飾された変異体。

29. 与えられたプロテアーゼが、エラスターーゼ、カテーテンG、C1エヌテラーゼ、トロンビン、カリクレイン、およびIXa因子、IXa因子、XIa因子、XXIa因子、VIIa因子、V'因子、活性化プロテインC、トリプシンおよびキモトリプシ

ンよりなる群から選ばれる請求の範囲28記載のプロテアーゼネキシンー1の修饰された変異体。

30. 下記の一般構造式：



[式中、R<sub>1</sub>およびR<sub>2</sub>は、それぞれ独立に、アミノ酸配列であり、Sは、それぞれ、R<sub>1</sub>およびR<sub>2</sub>のそれぞれのシステイン残基のチオ基であり、PEGはポリエチレンギリコールである]

を有する化合物。

31. R<sub>1</sub>およびR<sub>2</sub>が、それぞれ独立に、約6～約1,000個のアミノ酸を含む請求の範囲30記載の化合物。

32. ポリエチレンギリコールが200～10,000の分子量である請求の範囲30記載の化合物。

33. R<sub>1</sub>およびR<sub>2</sub>が同一である請求の範囲30記載の化合物。

34. R<sub>1</sub>がヘモグロビンa鎖であり、R<sub>2</sub>がヘモグロビンb鎖である請求の範囲30記載の化合物。

35. 下記の一般構造式：



[式中、R<sub>1</sub>およびR<sub>2</sub>は、それぞれ独立に、アミノ酸配列であり、Sは、R<sub>1</sub>およびR<sub>2</sub>のそれぞれのシステイン残基のチオ基であり、PEGはポリエチレンギリコールである]

を有する化合物。

36. ポリエチレンギリコールが200～10,000の分子量である請求の範囲35記載の化合物。

37. R<sub>1</sub>およびR<sub>2</sub>が同一である請求の範囲35記載の化合物。

38. R<sub>1</sub>がヘモグロビンa鎖であり、R<sub>2</sub>がヘモグロビンb鎖である請求の範囲37記載の化合物。

39. 請求の範囲1記載のプロテアーゼネキシンー1の変異体をコードしているDNA配列。

4 0 . 請求の範囲 2 記載のプロテアーゼネキシン-1 の変異体をコードしている  
D N A配列。

4 1 . 請求の範囲 4 記載のプロテアーゼネキシン-1 の変異体をコードしている  
D N A配列。

4 2 . 請求の範囲 5 記載のプロテアーゼネキシン-1 の変異体をコードしている  
D N A配列。

4 3 . 請求の範囲 8 記載のキメラプロテアーゼをコードしている D N A配列。

4 4 . 薬剤学上許容され得る担体と、請求の範囲 1 記載のプロテアーゼネキシン  
-1 の変異体とを含む薬剤学的組成物。

4 5 . 薬剤学上許容され得る担体と、請求の範囲 2 記載のプロテアーゼネキシン  
-1 の変異体とを含む薬剤学的組成物。

4 6 . 薬剤学上許容され得る担体と、請求の範囲 4 記載のプロテアーゼネキシン  
-1 の変異体とを含む薬剤学的組成物。

4 7 . 薬剤学上許容され得る担体と、請求の範囲 5 記載のプロテアーゼネキシン  
-1 の変異体とを含む薬剤学的組成物。

4 8 . 変異体タンパク質を製造する方法であって、

第一の天然に存在するタンパク質の受容体結合領域のアミノ酸をコードしてい  
る D N Aを、該第一のタンパク質とは異なる第二のタンパク質またはその生体活  
性部分のアミノ酸をコードしている D N Aに接続する段階と；

該 D N Aを適切な宿主中で発現させる段階と；  
を含む方法。

4 9 . 第二のタンパク質が、P 4 、P 3 、P 2 、P 1 、P 1' 、P 2' 、P 3'  
、P 4' よりなる群から選ばれる位置のアミノ酸残基が、その位置に天然に存在  
するアミノ酸残基とは異なる天然アミノ酸残基で置換されている P N -1 の変異  
体である、請求の範囲 4 8 記載の変異体。

5 0 . 受容体結合領域が、ウロキナーゼ、t P A、IX因子、X因子、プロテイン  
C、表皮増殖因子および E G P 様ドメインよりなる群から選ばれる第一のタンパ  
ク質由来する、請求の範囲 4 8 記載の方法。

5 1 . 受容体結合領域がウロキナーゼのアミノ末端断片である、請求の範囲 5 0

記載の方法。

5 2 . 受容体結合領域が、ウロキナーゼの第 1 ~ 1 3 5 番または第 1 ~ 8 7 番ア

ミノ酸を含むアミノ末端断片である請求の範囲 5 1 記載の方法。

5 3 . 薬剤学上許容され得る担体、および請求の範囲 8 記載のタンパク質または

その一部を含む薬剤学的組成物。

## 【発明の詳細な説明】

プロテアーゼネキシン1異変体を含むキメラ蛋白発明の分野

本発明は、一般的に蛋白質、蛋白質の類似体、および、蛋白質の生物学的活性を変化させるために特異的に蛋白質を改変する方法に関する。より詳しくいえば、本発明は蛋白質、例えばタンパク質分解酵素であるネキシン1の活性部位を同定し、類似体を製造するためにアミノ酸を一個以上変えて活性部位を変化させ、また、キメラ蛋白を製造するために、蛋白質の活性部位を全く別の蛋白質の活性部位に置換することに関する。本発明はまた、システイン残基、あるいは失活させることなしにシステインで置換できるアミノ酸残基を同定し、システインのチオ基にポリエチレングリコールを結合させて蛋白質の安定性を増加させることに関する。

発明の背景

蛋白質が体内で特異的な機能をもつことは、かなり前から知られている。例えば、組織の再造形、炎症、凝血、フィブリン溶解などの通常の生理的機能には蛋白質分解酵素が必要である。特に重要なのは、セリンプロテアーゼと呼ばれる構造的な分類に属するプロテアーゼである。セリンプロテアーゼ・ファミリーに属する機能蛋白のすべての活性部位は、セリン(名前はここから来た)、アスパラギン酸およびヒスチジンからなる特徴的な触媒三残基である。触媒部位のセリンの水酸基は、加水分解されるべきペプチド結合のカルボニル基の炭素を求核攻撃して、プロテアーゼをアシル化すると同時にペプチド結合を加水分解するのに関与する。この反応後、速やかに脱アシル化が起こり、元のプロテアーゼが解離する。

本発明の実施例を提供するために、本発明者らは、ヒト包皮細胞で調整された無血清培地から精製したセリン蛋白質であるプロテアーゼネキシン1(PN-1)に注目した(Scott,R.W. et al., J Biol Chem (1983) 58:104391044)。これは42kd(キロダルトン)の糖蛋白質で、線維芽細胞や筋管、心筋細胞、脈管平滑筋細胞から放

出される。この放出は、プラスノミノーゲン活性化因子の放出とともに起き、ホルボールエスチルやマイトジエンによって刺激を受ける(Eaton,D.L. et al., J Ce 11 Biol (1983) 123:128)。ネイティブなPN-1は約400アミノ酸からなる蛋白質で、およそ10%の糖質を含む。血清中にごく僅かしか存在しないため、間質細胞の表面上かその近くで機能しているようである。PN-1は、ウロキナーゼ酵素前駆体、プラスミン、トリプシン、トロンビンおよびファクターXaで知られているすべての活性化因子を阻害する(Eaton,D.L. et al., J Biol Chem(1984)259:6241)。PN-1はまた、組織プラスミノーゲン活性化因子とウロキナーゼを阻害する。しかし、PN-1はエラスターーゼやカテプシンGを阻害しない。

本発明者らは、以前の出願(現在の米国特許第5,87,089号)において、PN-1の反応部位領域が基質類似体となることに注目し、PN-1の反応部位の配列を変えればPN-1の活性を大きく変えることができ、よってプロテアーゼの特異性も変えられるのではないかと考えた。例えば、 $\alpha$ -1-抗トリプシンについて同様の仕事がなされ、その結果、改変されて治療に利用できる可能性をもつ変異体を得た(M.C ourthey et al., Nature(1985)313:149-151)。PN-1は、組織中に見られるという点で、大部分のセルビンと異なっており、また、組織に局在するための、高い親和性を有するヘパリン結合部位を持ち、プロテアーゼPN-1複合体のエンドサイトーシスを担う組織クリアランスレセプターを持つ。本発明者らは、エラスターーゼなどの生理的プロテアーゼの阻害因子となるPN-1変異体を製造することを可能とし、これによって薬学的に有用な活性を有する合成物を提供することを可能とした。

本発明者らは、エラスターーゼやカテプシンGを不活性化する変異体を含むいくつかの変異体をさらに発明し、また、様々なセリンプロテアーゼに関してプロテアーゼ特異性および2次結合速度定数を有意に変更した変異体を提供し、また、このような変異体を設計し生産する方法を提供するために、本発明者らの以前の研究を改善した。さらに、本発明者らは、元の分子に存在していたか、部位特異的突然変異誘発によって蛋白質の表面に導入された1個以上のシステイン残基にポリエチレンギリコールを特異的に結合させる変異体とそのような変異体を产生する方法、およびシステイン残基を導入するのに適した部位を決定する方法を提

供する。さらに本発明者らは、PN-1またはその変異体のプロテアーゼ阻害活性を有

するレセプター結合蛋白質の特異的局在能とを組み合わせて、特定の基質について目的とする生物的活性が得られるようにした変異体と、そのような変異体を產生する方法を提供する。

#### 発明の要約

本明細書では変異体とも呼ばれるキメラタンパク、および、その產生方法、調製方法、利用方法が開示される。5種の変異体の一般型が開示される。本発明にかかるI型変異体は、PN-1の活性部位内の一アミノ酸を元のアミノ酸とは異なったアミノ酸で置換する、部位特異的突然変異誘発によって製造される。本発明にかかるII型変異体は、PN-1の活性部位が変更される点ではI型変異体と類似している。しかし、II型変異体を製造するには、PN-1の活性部位を他のセルビンの活性部位に合致するように改変するが、この改変には一個以上のアミノ酸を置換したり、欠失したり、付加したりする必要がある。本発明にかかるIII型変異体は、PN-1の活性部位や一部を、特定のプロテアーゼに対する基質の配列に一致する配列で置換することによって製造される。IV型変異体は、ネイティブな蛋白質に存在するか部位特異的突然変異によって導入されたシステイン残基をポリエチレンジリコールとの結合に用いるために製造される。本発明にかかるV型変異体は、PN-1を異なったレセプターに局在させるために、他の蛋白質のレセプター結合領域とPN-1を融合させた融合蛋白質を製造することを含む。I型、II型、あるいはIII型変異体を本明細書では変異体と呼ぶことにする。ポリエチレンジリコールがチオ基に結合するIV型合成物をシステイン-PEG化蛋白と呼び、V型変異体は融合蛋白あるいはキメラ蛋白と呼ぶ。

本発明においては、I型、II型、III型、IV型、V型のすべてまたはいずれかの変異体を一個以上含む薬剤組成物を提供する。

本発明の重要な目的は、特にPN-1変異体において、特殊でかつ必要とされる生物活性を有する異なった変異体を広い範囲で提供することである。

別の目的は、PN-1の活性部位中の一アミノ酸を変えるために部位特異的突然変

異誘発を用いてPN-1変異体を提供することである。

他の重要な目的は、PN-1の活性部位を、他の酵素の阻害因子、好ましくは他の

セルビンの活性部位に合致するように特異的に変更して、PN-1変異体を提供することである。

さらに、本発明の重要な目的は、PN-1に他のプロテアーゼの基質配列を入れて、そのプロテアーゼの活性を阻害できるようにした、プロテアーゼネキシン1の変異体のような変異体を提供することである。

さらに、別の重要な目的は、チオ基に結合してPEG化する、すなわちポリエチレングリコールが蛋白質中の、ジスルフィド結合に関係しないシテインアミノ酸に結合する蛋白質を提供することである。

別の重要な目的は、まず、該蛋白質あるいは構造的に関連する蛋白質が通常ケリコシル化されている部位にシスティン残基を付加するために部位特異的突然変異誘発を行い、次いで、ポリエチレングリコールをシスティン残基に結合させて蛋白質にポリエチレングリコールを結合させる方法を提供することである。

別の重要な目的は、まず、蛋白質に該蛋白質の表面のある部位にシスティン残基を付加するために部位特異的突然変異誘発を行い、次いで、PEGをシスティン残基に結合させて蛋白質にPEGを結合させる方法を提供することである。

別の重要な目的は、蛋白質と反応する部分を2箇所もつPEGを含む試薬との反応によってクロスリンクした2量体ないし多量体蛋白質を提供することである。

さらに、別の重要な目的は、PN-1を異なったレセプターに局在させるために、他の蛋白質のレセプター結合領域をPN-1に連結させた融合蛋白質を提供することである。

本発明の他の目的は、本発明にかかる合成物を散在させている賦形担体素材を含む薬剤組成物を提供することである。

本発明の別の目的は、本発明にかかる賦形剤と合成物を含む組成物の薬学的有効量をそれを必要とする患者に投与することを含む処置に関する治療方法を提供することである。

本発明の特徴は、新しい結合部位を連結した蛋白質の本来の生物学的活性を維

持しつつ、特異的なレセプター結合部位をもつように変異体を設計できるところにある。

本発明の利点は、本来の蛋白質に較べて、変異体が一定の蛋白質分解酵素に対

して実質的に異なる阻害的な効果をもつことである。

本発明の別の目的は、特異的な生物活性に関連した疾患の治療に役立つ変異体を提供することである。

本発明のさらには別の利点は、エラスターーゼ関連症の治療に役立つ変異体を記述し、開示していることにある。

本発明の別の特徴は、本来の蛋白質に較べると、変異体がプロテアーゼ特異性を実質的に変えている点である。

本発明の他の利点は、特定のセリンプロテアーゼに関し、本来の蛋白質がもつ2次の会合速度定数に較べて、ある変異体が実質的に高い2次の会合速度定数をもつことである。

本発明の他の利点は、特定のセリンプロテアーゼに関し、本来の蛋白質がもつ2次の会合速度定数に較べて、ある変異体が実質的に遅い2次の会合速度定数をもつことである。

さらに、別の目的は、注射用処方剤やスプレー用処方剤、エアロゾルの形状による薬剤組成物を用いて行われる、注射や鼻孔内または肺内輸送などの運搬方法を提供することである。

別の利点は、蛋白質のシステイン残基にポリエチレンギリコールを結合させることで、生物学的に安定した蛋白質を製造できることである。

別の利点は、好ましくは、元々グリコシル化される位置にある、蛋白質のシステイン残基でポリエチレンギリコール分子を蛋白質に容易に結合させるための方法論を提供することである。

さらに、別の利点は、システインで置換されるアミノ酸残基を選択するのに、統いて起こる置換されたシステイン残基のチオ基へのポリエチレンギリコールの結合により、システイン-PEG化蛋白質が生物学的活性を失うことなしに、野生型の蛋白質よりも生物学的な安定性を増大させるように選択できることにある。

別の利点は、通常、生物学的安定性のためにグリコシル化が必要とされる蛋白質を、原核生物宿主中、あるいは、グリコシル化される組み換え蛋白質のための体制をもたない他の宿主中で発現させて商業的に生産できることにある。原核生物宿主中で蛋白質を発現させた後、蛋白質の本来のシステイン残基または製造さ

れたシステイン残基にポリエチレングリコールを結合させて生物学的な安定性を強化することができる。

別の利点として、システイン-PEG化蛋白質は、従来のようにポリエチレングリコールを蛋白質に結合させるために、蛋白質をジオキサンや塩化シアヌル、DMFその他の化学薬品のような毒性の高い化学剤にさらすことなく、产生できることにある。

本発明のこれらの及びその他の目的、利点および特徴は、以下により詳細に記載されるところの構造、合成、処方および利用法、さらには、本明細書の一部をなす添付の図面を参照すれば、当業者にとって明らかになるであろう。

#### 図面の簡単な説明

図1は、PN-1 $\alpha$ のコーディング領域の塩基配列とそれから導き出されたアミノ酸配列を示し、

図2は、PN-1 $\beta$ のコーディング領域の塩基配列とそれから導き出されたアミノ酸配列を示す。

図3は、X線結晶学により決定されたPN-1の3次元構造の概略図である。特に関心があるアミノ酸残基のおおよその位置が、当該ヘリックス(h)あるいは $\beta$ -シート(s)の中の相対的位置に従って示されている。PN-1蛋白のヘリックスと $\beta$ -シートにはそれぞれ文字が付けられている(例えば、A,Bなど)(Engh, et al., 1990 Protein Engin. 3(6):469-477)。

図4は、本発明にかかる方法で製造されたシステイン-PEG化PN-1変異体(N99C:N140C)を含む反応液サンプルの活性(白い四角)と従来の方法によって製造されたPEG化PN-1変異体(N99C:N140C)を含む反応液サンプルの活性(黒いひし型)を示したグラフである。

#### 好みしい態様の詳細な説明

本発明の合成物、変異体、処方およびそれらを作製、使用するための方法を説明する前に、本発明が、説明される特定の合成物、変異体、処方および方法に限定されるものではないことを理解されたい。当然ながら、このような変異体、処

方あるいは方法は様々である。本明細書で用いられる用語は、特定の態様のみを説明するためのものであり、限定するためのものではない。本発明の範囲は、添付の請求の範囲のみによって限定されるものとする。

本明細書と添付の請求の範囲において、單数形が用いられるときは、文中で別途、明確に示されない限り、その指示物は複数の場合を含むことに注意されたい。従って、例えば、「プロテアーゼネキシン1変異体」というときは、そのような変異体の混合物を含み、「類似体」というときには、そのような類似体の混合物を含み、また、「治療方法」というときは、当業者に知られているはずの、あるいは、この明細書を読めば分かるはずの治療のタイプに関する一つ以上の方法を指すことを含んでいるなどである。

#### A. 定義

本明細書で用いられている「プロテアーゼネキシン1」と「PN-1」は互換的に用いられ、それぞれ図1と2に示されたPN-1 $\alpha$ とPN-1 $\beta$ を構成するDNAのコドンとそれからできるアミノ酸配列を表す。PN-1は、他の2つのネキシンプロテアーゼ因子PN-IIおよびPN-IIIと区別されうる(Knauer,D.J. et al., J Biol Chem (1982) 257:15098-15104)。これらもトロンビンの阻害因子であるが、このプロテアーゼへの結合は強くなく、異なる分子量と3次元構造および機能構造をもつ。

「変異体」、「蛋白質変異体」および「キメラ蛋白」という用語を、本明細書では互換的に用いており、元の蛋白質の、あるいは、構造に多少の変化を加えられてはいても元の蛋白質の生物学的活性のある部分のアミノ酸配列に相当するアミノ酸配列を表す。本発明による定型的な変異には、(1)本来のアミノ酸配列の中の一個以上のアミノ酸を、元の蛋白質に存在するアミノ酸とは異なる一個以上のアミノ酸で置換すること、および／または(2)本来の配列に一個以上のアミノ酸を付加し、アミノ酸のそのような付加が変異体の生物学的活性を変えるもの、および／または(3)本来の配列から一個以上のアミノ酸を欠失させること、および／

または(4)ポリエチレングリコールを配列中の、本来の、あるいは、人為的に導入したシスティン残基のチオ基に結合させること、および／または(5)元来ある2つの配列を融合する、すなわち普通には結合しない2つの配列を融合することが含まれる。

「プロテアーゼネキシン1変異体」と「プロテアーゼネキシン1の類似体」は、本

明細書で、I型変異体を定義するために同義的に用いられる語であり、従って、「変異体」という用語に包含される。これらの用語は、一般的には、プロテアーゼネキシン1中の一個以上のアミノ酸を異なったアミノ酸で置換した蛋白質を表そうとしたものである。より限定的には、本発明にかかるプロテアーゼネキシン1変異体は、活性部位あるいはその近傍で異なったアミノ酸に置換されている以外は、プロテアーゼネキシン1と実質的に同じアミノ酸配列を含む。特に、異なったアミノ酸による置換は、P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub>、P<sub>3</sub>、P<sub>4</sub>の部位のいずれか、および／またはP<sub>1'</sub>、P<sub>2'</sub>あるいはP<sub>3'</sub>、P<sub>4'</sub>部位のいずれかで行われうる。プロテアーゼネキシン1配列中のアミノ酸のその他の置換や消失も本発明に包含されるが、特定のプロテアーゼに関する変異体の特異性および／または反応性を変更するという点では、活性部位あるいはその近傍での置換が最も重要である。本発明にかかる特に好ましいプロテアーゼネキシン1変異体は、本来のPN-1がほとんどあるいは全く活性を示さない基質に関して強い活性を示す変異体で、このような変異体は、エラスターーゼを阻害し、特に、エラスターーゼを阻害するとともにヘパリンおよび／またはヘパリン様化合物の存在下で活性が増大するエラスターーゼを阻害することができるものをいう。他の好ましいプロテアーゼネキシン1変異体は、例えば、ウロキナーゼおよび／または他のセリンプロテアーゼを阻害する効果を、プロテアーゼネキシン1に較べて増大させている。

「コントロール配列」とは、目的のコーディング配列が適切に接続されれば、コントロール配列に適合性をもつ宿主中で発現させることができるDNA配列のことをいう。このようなコントロール配列は、少なくとも原核生物宿主および真核生物宿主のプロモーター配列を持ち、好ましくは転写終結シグナルを持つ。発現を行わせるのに必要なあるいは有用な付加的因子も認められるであろう。「コント

「ロール配列」は、本明細書で用いられるときには、単に、特定の宿主を用いて発現させるのに必要なあらゆるDNA配列を示す。

「細胞」、「細胞培養」、「組み換え宿主細胞」あるいは「宿主細胞」は、文脈から明らかになるように、しばしば互換的に用いられる。これらの用語には、直接実験対象となった細胞と当然ながらその後代が含まれる。偶発的な突然変異や環境の違いのせいで、すべての後代が、必ずしも親細胞と全く同じではないことは知ら

れている。しかしながら、そのように変異した後代も、その後代が最初に形質転換された細胞に関連した特質を保持する限り、これらの用語に含めるものとする。本件では、例えば、このような特質とは組み換えPN-1の産生能であろう。

「精製された」あるいは「精製した」という用語は、通常そのままの状態では混在している物質を除いた材料を示す。したがって、「精製した」PN-1コーディングDNAとは、もとの環境から単離された状態にあり、元来PN-1を产生している細胞が通常产生するその他の蛋白質をコードするDNAの混入がないものをいう。「精製した」PN-1とは、ヒトその他の哺乳動物の組織中の元の環境で通常共存する物質を含んでいないPN-1をいう。勿論、「精製した」PN-1は、グリコシド残基のようなPN-1と共有的に結合する物質や、例えば、治療薬としての処方剤ために導入された物質を含むかもしれない。「精製した」という語はまた、他の化合物を結合させるため、および／または治療的処置あるいは診断的処置において用いられる処方剤を提供するために、ポリエチレングリコールやビオチンなどの化合物やその他の物質の一部が変異体に結合したものを含む。「精製した」というのは、単に、当該の基質を本来の環境と、通常それが共存する物質から分離した状態をいう。勿論、本明細書で請求されているDNAは、精製された、通常それと混在する物質を含まないものであるが、PN-1をコードするDNAは、例えば、DNAがcDNAライブラリーから採られたときは、メッセンジャーの非コード領域を逆転写する結果できる、コーディング配列の5'端および／または3'端の付加的な配列を含んだり、あるいは、成熟蛋白質をコードする配列だけではなくシグナル配列の逆転写産物を含むかもしれない。

DNA配列について、「縮重した」とは、参照されたアミノ酸配列と同じ

配列をコードする塩基配列をいう。

「操作して結合した」というのは、構成成分の本来の生化学的機能など、必要とする機能を果たせるように構成して配置することをいう。したがって、コーディング配列に操作して結合したコントロール配列やプロモーターは、コーディング配列の発現を可能にする。

「ヘパリン」、「ヘパラン硫酸」および「ヘパリン様化合物」は、本明細書では同義的に用いられている用語である。これらの用語をそれぞれ単独で、あるいは他と

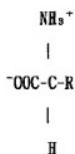
組み合わせて、一般的に硫酸多糖といわれる化合物の一大グループに包含させようとしている。硫酸多糖には、プロテオグリカン、およびヘキソサミンとアルドウロン酸が交互につながった共重合体であるグリコサミノグリカン(GAG)が含まれる。これらの共重合体は、硫酸化された状態で見られ、プロテオグリカンとして合成され、まとめてムコ多糖と呼ばれる。デキストラン硫酸などの他の化合物は、本発明の目的からすると、「ヘパリン様」と考えられる。同じように、交互につながった共重合体で、特に、強度に硫酸化されているために強く負に荷電しているものは、本発明においては有用な「ヘパリン様」化合物である。グリコサミノグリカンなどの「ヘパリン」および「ヘパリン様化合物」に関するより広範囲な情報は、糖質の化学と生化学の進歩43巻51-134ページに発表された「ヘパリンの構造と生物学的活性」の中でベニト・ケイヌ(Benito Casu)に詳細に述べられており、この文献は、本明細書で開示されたPN-1変異体と組み合わせることで有効な化合物を開示するために、本明細書に参照文献として包含される。

本発明の説明を分かり易くするために、アミノ酸の一文字記号と三文字略記の関係を以下の一覧表に示す。

<u>一文字記号</u>	<u>三文字記号</u>
A アラニン	ala
C システイン	cys
D アスパラギン酸	asp
E グルタミン酸	gln
F フェニルアラニン	phe

G グリシン	gly
H ヒスチジン	his
I イソロイシン	ile
K リジン	lys
L ロイシン	leu
M メチオニン	met
N アスパラギン	asn
P プロリン	pro
Q グルタミン	gln
R アルギニン	arg
S セリン	ser
T スレオニン	thr
V バリン	val
W トリプトファン	trp
Y チロシン	tyr

アミノ酸は、以下のような一般構造式を有する。



そして、「R」基の化学的組成に基づいて以下のように分類する。

1. 脂肪族
2. 水酸基
3. 硫黄基
4. 芳香族
5. 酸性（およびアミド）
6. 塩基性

### 7. アミノ基

自然界に存在するアミノ酸は、一般的に、極性か非極性かで、以下のように分類される。

極性 S、T、C、Y、D、N、E、Q、R、H、K

非極性 G、A、V、L、I、M、F、W、P

アミノ酸が極性か非極性かを決めるのは「R」基である。

アミノ酸残基は、一般的に、以下のように4つの大きな分類群に下位分類される。

酸性基：この残基は、生理的pH下で水素イオンを失うために陰性に荷電してお

り、水溶液に引きつけられるため、この残基を含むペプチドが生理的pHの水溶媒中でとる立体構造の表面に位置しようとする。

塩基性基：この残基は、生理的pH下で水素イオンと結合するために陽性に荷電しており、水溶液に引きつけられて、この残基を含むペプチドが生理的pHの水溶媒中でとる立体構造表面に位置しようとする。

中性/非極性基：この残基は、生理的pH下では荷電しておらず、水溶液に忌避されるため、この残基を含むペプチドが水溶媒中あるとき、このペプチドがとる立体構造の内部に位置しようとする。これらの残基は、ここでは「疎水性」とも呼ばれる。

中性/極性基：この残基は、生理的pH下では荷電していないが、水溶液に引きつけられるため、この残基を含むペプチドが水溶媒中あるとき、このペプチドがとる立体構造の外部に位置しようとする。

それぞれの残基の分子を統計的に集めると、荷電するものもしないものもあり、水溶媒に引きつけられたり、反発したりするのにも大小の程度があることは、当然のことである。「荷電した」という定義に適合するのは、各分子のかなりの割合（少なくとも25%程度）のものが、生理的pH下で荷電しているときである。極性基と非極性基に分類するために必要とされる誘引あるいは忌避の程度は、恣意的なものなので、本発明で特に考慮されたアミノ酸については、はっきりとどちらかに分類した。特に分けられていない大部分のアミノ酸は、既知の作用に基づ

いて分類できる。

アミノ酸残基は、環状か非環状か、芳香族か非芳香族か、残基の側鎖置換基に関する自明な分類によって、あるいは大きいか小さいかによって、さらに下位分類できる。残基に、カルボキシル基の炭素を入れて全部で4個以下の炭素原子しか含まれていなかったら、その残基は小さいとみなされる。当然ながら、小さな残基は必ず非芳香族である。

自然界に存在する蛋白質のアミノ酸の、前述のスキームにしたがった下位分類は以下の通りである：

酸性：アスパラギン酸とグルタミン酸

塩基性/非環状：アルギニン、リシン

塩基性/環状：ヒスチジン

中性/極性/小型：スレオニン、セリン、システイン

中性/極性/大型/非芳香族：スレオニン、アスパラギン、グルタミン

中性/極性/大型/芳香族：チロシン

中性/非極性/小型：アラニン

中性/非極性/大型/非芳香族：バリン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン

中性/非極性/大型/芳香族：フェニルアラニン、トリプトファン

プロリン

遺伝子がコードするアミノ酸のプロリンは、技術的には中性/非極性/大型/環状で非芳香族のグループに入るが、ペプチド鎖の2次構造に影響を与えることが知られているために特別なので、この定義のグループには入れず、独自のグループに入れられる。

遺伝子にコードされたアミノ酸に対する他のアミノ酸置換もまた、本発明の範囲のペプチド合成物に含まれ、この一般的な分類表の中に分類される。

本発明の変異体は、遺伝子コードにはコードされていないが、普通に見られるアミノ酸を含み得る。例えば、 $\beta$ -アラニン( $\beta$ -ala)、あるいは、3-アミノプロピオン酸、4-アミノ酪酸などの他のオメガ-アミノ酸、 $\alpha$ -アミノイソ酪酸(Aib)、サルコシン(Sar)、オルニチン(Orn)、シトルリン(Cit)、t-ブチルアラニン(t-

BuA)、t-ブチルグリシン(t-BuG)、N-メチレイソロイシン(N-Melle)、フェニルグリシン(Phg)、およびシクロヘキシラニン(Cha)、ノルロイシン(Nle)、システイン酸(Cya)、およびメチオニンスルホキシド(MSO)。これらはまた便宜上、特定のカテゴリーに分けられる。

上記の定義に基づくと、

Sarと $\beta$ -alaは、中性/非極性/小型；

t-BuA、t-BuG、N-Melle、NleおよびChaは、中性/非極性/大型/非芳香族；

Ornは塩基性/非環状；

Cyaは酸性；

Cit、アセチルLysおよびMSOは、中性/極性/大型/非芳香族；

そして、Phgは中性/非極性/大型/芳香族である。

遺伝子コードであるいは他の方法でコードされたアミノ酸のL型およびD型異性体とともに、できた蛋白質が必要な活性をもっていれば、本発明において有用なアミノ酸として包含される。

様々なオメガ-アミノ酸は、大きさによって中性/非極性/小型( $\beta$ -ala、すなわち3-アミノプロピオン酸、4-アミノ酪酸)、あるいは大型(他のすべて)に分類される。

本発明の合成物を示すために用いられた表示法は、ペプチド中の各アミノ酸のアミノ基は左側に、カルボキシル基は右側に書くものとしている従来の慣習に従った。本発明の選ばれた特別の態様を表す化式において、アミノ末端とカルボキシル末端は特に示さないことが多いが、特に言及しない限り、生理的pH値下ではそれらはその形態で存在するものとする。したがって、限定的な実施例においても、一般的な化式においても、N末端の $\text{H}^+$ とC末端の $\text{OH}^-$ は必ずしも特には示さないが、生理的pH値下では存在すると理解されるべきである。

#### セリンプロテアーゼとそれらの阻害因子(セルビン)

セリンプロテアーゼファミリーに属する酵素は、元来は作用機作に因んで名付けられたものであるが、配列上や構造上でも相當に類似性が高い。セリンプロテアーゼの中には、非常に特異性が高く、特定の標的蛋白質の一定のペプチド結合

しか切断しないものもあるが、特異性なしに多くの標的蛋白質を小さなペプチドに分解してしまうものもある。

セリンプロテアーゼは多くの段階で制御を受ける。あるものは不活性な酵素前駆体として合成され、特定の場所で特異的な場合にのみ活性化される。このため、身体は、すでに蓄えている蛋白質分解活性因子を活性化して、生理的な変化に速やかに対応できるのである。例えば、凝血活性のカスケードを開始させるような傷害に反応して、ファクターXやプロトロンビンなどの循環している酵素前駆体が連続的に活性化されると凝血反応がおきる。さらに、蛋白質分解活性はレセプター結合部位など、プロテアーゼや酵素前駆体の局所的濃度が活性化に備えて高くなるような特異的な部位にしばしば局在する。

蛋白質分解活性は、活性化されても、空間的および時間的に制約を受けることが極めて重要である。このような制約は、蛋白質分解活性を阻止する特異的阻害

因子が存在することしばしば可能になる。関連する蛋白質の主要なファミリーであるセリンプロテアーゼ阻害因子すなわち「セルビン」が、セリンプロテアーゼの制御において鍵になる。セリンプロテアーゼ同様、セルビンも最初は共通の作用機構によって定義されたが、配列に関しても、構造に関しても類似性が高いことが後になって分かった。

セルビンはすべて、両側を可変的な $P_1$ および $P_1'$ によって区切られる反応ペプチド結合をもつ阻害部位を含む。作用部位から左側の方向に離れるにつれて、アミノ酸は $P_1$ 、 $P_2$ 、 $P_3$ などと呼ばれる。作用部位から右側の方向に離れるにつれて、アミノ酸は $P_1'$ 、 $P_2'$ 、 $P_3'$ などと呼ばれる。 $P_1$ 残基は、反応ペプチド結合を通常の基質と同じように攻撃する標的プロテアーゼの基質結合ポケットよって認識される。しかし、ペプチド結合の加水分解とプロテアーゼの解離は完全には進まない。通常の脱アシル化過程が非常に緩慢なため、反応が実質的に不可逆的になり、プロテアーゼは等モル濃度の複合体となって、安定な状態でトラップされる。

プロテアーゼネキシン1(PN-1)はセルビンファミリーの一員である。PN-1は、線維芽細胞、グリア細胞、血小板、マクロファージなど、様々なタイプの細胞

で產生される。PN-1は細胞から分泌されて、細胞外で標的のセリンプロテアーゼに結合して、それを阻害する。そして、PN-1とプロテアーゼの複合体は細胞表面にある特異的レセプターに再び結合し、そこから細胞内に取り込まれて分解される。

PN-1は構造的にも、機能的にも抗トロンビン(AT-III)に非常によく似ている。AT-IIIは、主に血漿の凝血阻止成分である。血漿中でのトロンビンのAT-IIIによる阻害効果は、普段とても低いが、血管の内皮層にヘパリンあるいは他のムコ多糖が存在するとかなり上昇する。ヘパリンが血液の「希釈剤」として、治療学上の利値があるのは、AT-IIIの活性を促進するためである。AT-III同様、PN-1にも高い親和性をもつヘパリン結合部位があり、ヘパリン存在下では、ずっと急速に(50-100倍)トロンビンを阻害する。従って、PN-1には抗凝血剤として治療学上の利用可能性がある。

一方、PN-1は、多くの点でAT-IIIとは異なっている。AT-IIIとは違って、PN-1はまた、トリプシンだけでなく、フィブリン溶解酵素ウロキナーゼとプラスミンの効果的な阻害因子である。さらに、PN-1は血漿中に有意な量を見出せず、主に

組織中で機能しているのかもしれない。PN-1の強い親和性をもつヘパリン結合部位は、表面や周囲の細胞外基質に硫酸プロテオグリカンを含む細胞や結合組織にPN-1を局在させるのに役立っている。したがって、PN-1の主要な役割は、血液とは対照的に、組織中の蛋白質分解活性を制御することにあるらしい。PN-1の役割をさらに明らかにする事実として、PN-1が脳組織に存在していることが分かった。末梢神経の再生と神經突起の伸長に関わっているのかもしれない。

PN-1がセリンプロテアーゼを阻害する相対的効率は、以前ピース(Bieth,J.C.)  
(Bull. Euro. Physiopath. Resp. (1980)16:183-195)によって説明され、スコット  
ら(Scott et al.)(J. Biol. Chem. (1985)260:7029-7034)によって報告された  
2次会合速度定数( $K_{ass}$ )によって測定することができる。これらの文献は、  
ここにおいて会合速度定数の意味を開示し説明するために参照文献として包含さ  
れる。一般的には、特定のプロテアーゼと阻害因子の反応に関して、 $K_{ass}$ の値  
が $1 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 以上であれば生理学的には重要だと考えられる(Travis and Sa

Iveson Ann. Rev. Biochem. (1983) 52:655-709)。K<sub>ass</sub> すなわち会合速度定数は、モル数と秒数の逆数を単位にしているので、K<sub>ass</sub> が大きくなるほど阻害は速やかになる。したがって、K<sub>ass</sub> 値は常に特定の酵素に関する値として与えられ、もし、酵素の阻害が起らなかったら値は0になる。

エラスターーゼ- $\alpha$ -1抗トリプシンやプラスミン- $\alpha$ -2-抗プラスミンなど、多くの生理学的に重要なプロテアーゼ阻害因子の反応は、 $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$  以上の速度定数で起こる。トロンビン-PN-1反応は、ヘパリン存在下では同じ速度で起こる。

#### PN-1の説明 ( $\alpha$ と $\beta$ )

図1と2にそれぞれ、PN-1 $\alpha$ とPN-1 $\beta$ のアミノ酸配列を示す。 $\alpha$ 型と $\beta$ 型は、PN-1 $\alpha$ のarginine がPN-1 $\beta$ ではthreonine-glycineに置換されているところが異なる。PN-1の反応中心部位の配列を、抗トロンビンIIIなどの他のセルビンの配列と比較してみると、アルギニン345(PN-1 $\beta$ では346)が反応中心部位すなわち「P<sub>1</sub>」部位であると推測される。「P<sub>1</sub>」部位(PN-1 $\alpha$ では345番目、PN-1 $\beta$ では346番目のアルギニン)は、トロンビンとの複合体から離れるときにPN-1から解離するペプチド断片の配列決定によって確認されている。さらに、PN-1は通常、トロンビン、プラスミン、トリプシン、プラスノミノーゲン活性化因子あるいは血漿カリクラ

インのようにアルギニンの位置(「P<sub>1</sub>」残基)で切断する酵素だけを阻害する。

以上のことに基づいて、図1と2のそれぞれに示されたPN-1 $\alpha$ とPN-1 $\beta$ の配列を参照すると、「P<sub>1</sub>」部位は、PN-1 $\alpha$ では346番目のセリン、PN-1 $\beta$ では347番目のセリンだということがわかる。

#### プロテアーゼ阻害因子の作用の説明

身体が速やかに反応できるよう、いくつかのセリンプロテアーゼが不活性な酵素前駆体の形で、比較的の高濃度に合成されていて、特定の出来事が起きたときにだけ活性化される。例えば、傷害に対する反応において、ファクターXやプロトロンビンのような循環性の酵素前駆体が連続して活性化されると、凝固反応が起きる。この活性化が凝血作用のカスケードを引き起こす。蛋白質分解活性は、し

しばしばレセプター結合部位などの特定の部位に集中する。蛋白質分解酵素は一度活性化されると、その酵素活性は、空間的にも時間的にも制約されることが非常に重要である。このような制約は、部分的にはセルビンの阻害効果によってもたらされる。

セルビンはすべて、両側をP<sub>i</sub>およびP<sub>i'</sub>残基によって区切られる反応ペプチド結合をもつ阻害部位を含む。「P<sub>i</sub>」残基（例えば、PN-1 $\alpha$ では345番目の、PN-1 $\beta$ では346番目のアルギニン）が、標的プロテアーゼの基質結合ポケットによって認識される。（プロテアーゼによる阻害因子の「反応」部位を認識すると、プロテアーゼは、阻害因子の反応ペプチド結合が通常の基質であるかのように攻撃する。しかし、セルビンの場合はペプチド結合の加水分解とプロテアーゼの解離は完全には進まない。通常の脱アシル化過程が非常に緩慢なため、反応が実質的に不可逆的になり、プロテアーゼは阻害因子と共に結合して、等モル濃度の複合体となって、安定な状態でトラップされる。P<sub>i</sub>残基は、標的プロテアーゼの基質結合ポケットによって認識される優勢な決定基であるため、この残基を変更すると、阻害因子のプロテアーゼ特異性を完全にかえるか、得ることのできる阻害効果の程度が実質的に変化する。P<sub>i</sub>残基近傍の残基（すなわちP<sub>i-1</sub>-P<sub>i+1</sub>）もプロテアーゼ特異性に影響する。したがって、これらの残基を変えることでも、阻害効果を変更する結果になる。

#### 変異体一般

多くの天然蛋白質のアミノ酸配列、活性部位および生化学的活性が知られており、特に天然のセルビンも知られている。ある種のプロテアーゼに関して、高度の活性をもつ蛋白質もあり、そのプロテアーゼには実質的に活性をもたない蛋白質もある。本発明者らは、この知見に注目し、指向的な方法で、その活性部位を、該プロテアーゼに関して全く異なる活性をもつ別の蛋白質の活性部位で置き換えて、特定の蛋白質のプロテアーゼ阻害活性を変えることができるだろうと考えた。あるいは、最初の蛋白質に、2番目の蛋白質レセプター結合領域を連結させて、本発明の変異体を製造できる。異なった蛋白質の生化学的機能と蛋白質結合特異性は分かっているので、本発明の方法によって、一定の論理的演繹を行うこと

が可能になり、蛋白質の活性（例えば、結合活性）が変わるだけでなく、特異的で指向的な方法で変わるという比較的強い期待をもって、特異的な変異体を製造する事が可能になる。

本発明にかかるキメラ（V型変異体）製造の実施例を以下に述べるようにして実行した。第一の蛋白質には、該レセプターに関しては実質的に結合力がないことが分かっており、第二の蛋白質には、このレセプターに関して非常に強い結合力があることが分かっている。（レセプターは、何らかの蛋白質あるいはその一部、リガンド、細胞表面領域あるいは分子である。）第二の蛋白質の結合領域を第一の蛋白質に繋げることによって、第一の蛋白質の生化学的機能をもち、それ以前には第二の蛋白質だけしか結合できなかったレセプターに結合できる変異体を提供することができる。結合特異性を利用し、2つの異なる蛋白質の生化学的活性を利用して、本発明の方法を利用した特殊な実施例を以下に述べる。

本発明の変異体が利用される特異的な状況を以下に述べる。単球と好中球が血流から炎症組織に移行するには、相互作用する部位での活性化が必要である。この活性化には、接着分子の発現と移行装置の補充が含まれる。内皮を通って移行するためには、基底膜と細胞外基質を含んだ細胞間連結部が分解されなければならない。ウロキナーゼ型プラスミノーゲン活性化因子（uPA）-プラスミンのシステムが、細胞外におけるタンパク質分解の調節に重要な役割を演じていることが今や明らかになっている。すなわち、好中球が血管内皮層を通して、回りの組織に移行して行くために、細胞内の結合を壊す上でuPA-プラスミンが重要である。

好中球細胞が内皮を通って周囲の組織に移行することは必要であるが、あまり多くの好中球があまりに速く移動すると、組織に不必要的炎症を起こさせることになり、恐らく、炎症組織を通過する血液の流れを妨げることになる。変異体で、(1)活性化された内皮細胞に結合し、(2)uPA-プラスミンを阻害するものは、特定の部位で炎症を防止し、および/または、抑制したりするのに役立つ。

腫瘍細胞の侵襲性も、腫瘍細胞転移モデル系(Ossowski and Reich, 1983; Heiring, et al., 1988)、および、細胞外基質分解と基底膜侵襲(Cergman, et al., 1

986; Mignatti, et al., 1986; Reich, et al., 1988; Cajot, et al., 1990)で示されたようにuPA-プラスミンシステムに依存している。ヒトの乳癌組織では、uPAの濃度が正常組織に較べて、かなり高くなっている。モデル系では、悪性細胞の侵襲性の増加に比例して、uPARの量が増加する(Ossowski, 1988; Hearing, et al., 1988)。uPAやプラスミンの蛋白質分解活性を妨げる因子が、細胞外基質の分解や基底膜の侵襲を防ぎ、炎症を防止するのを助けているのであろう。同様に、ウロキナーゼがウロキナーゼレセプター(uPAR)と相互作用するのを妨げる因子が、転移を阻止しているのかもしれない。

本発明の変異体蛋白は、ウロキナーゼレセプターをブロックして、ウロキナーゼを阻害するように設計することができる。特に、ウロキナーゼレセプターをブロックする能力とウロキナーゼおよびプラスミンを阻害する能力とを組み合わせて、炎症を防止ないし軽減する効果をもつ変異体を产生することができる。このような変異体は、どちらかの蛋白質だけを用いたときよりも、炎症を防止したり軽減したりする上で効果的である。変異体のウロキナーゼレセプター結合能力を利用すれば、変異体を細胞外基質分解が起きる、目的の特異的な部位に局在させて、酵素を阻害し、分解の原因となる酵素の結合を妨げれば、それ以上の分解を特異的に防止できる。こうすれば、炎症を軽減ないし防止する二重の効果が生じる。

本発明のキメラ蛋白を製造するために、uPAとuPARが癌の侵襲と炎症において果たす中心的な役割を調べた。この知見によって、本発明が、uPAのuPARへの結合を妨げて、細胞の侵襲部位で発生するuPAとプラスミンの両者を阻害するキメラ蛋白を提供することが分かった。

uPAのレセプター結合領域は、アミノ末端断片(ATF)の135番目の残基に位置している。この領域(すなわち、ATF)は、高い親和力をもってuPARに結合し( $K_d$ は0.1から1 nM)、競合的にuPAのuPARへの結合を阻止する。  
PN-1は、インビトロ(in vitro)で、腫瘍細胞に媒介される細胞外基質の分解と腫瘍細胞の移動を妨げる。ここでPN-1は、uPA-プラスミンシステムを阻害した。腫瘍転移と白血球の侵襲を、より効果的で特異的に阻害する因子を製造するた

めに、本発明は、uPAとPN-1のアミノ末端断片（ATF-PN1）を含むキメラ蛋白を提供する。ATF部位が存在するために、このキメラ蛋白は細胞侵襲部位に高い親和性をもち、PN-1蛋白質をもつために、uPAとプラスミンを阻害する。

#### I型変異体

本発明のこの局面は、反応部位を何らかの方法で改変するために、PN-1のアミノ酸配列を操作して、セリンプロテアーゼに対するPN-1のプロテアーゼ特異性あるいは阻害効果の強さを変えることに関する。より特異的には、本発明は、プロテアーゼネキシン1の作用部位に影響を与えるため、プロテアーゼネキシン1の一個以上のアミノ酸を置換し、および/または、プロテアーゼネキシン1の配列にアミノ酸を欠失あるいは付加することを含む。これは、セリンプロテアーゼに対するプロテアーゼネキシン1のプロテアーゼ特異性、および/または、阻害効の強さを変えるためである。一般的に、プロテアーゼ特異性あるいは阻害効果の強さは、P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub>、P<sub>3</sub>、P<sub>4</sub>あるいはP<sub>1'</sub>、P<sub>2'</sub>、P<sub>3'</sub>、P<sub>4'</sub>部位のアミノ酸を置換して変更することができる。さらに特異的には、本発明は、「P<sub>1</sub>」部位のアルギニン残基と「P<sub>1'</sub>」部位のセリンのいずれかあるいは両者を異なった残基で置換して、プロテアーゼ特異性が全く異なるPN-1変異体、および/または、特定のセリンプロテアーゼに対する異なる阻害効果をもつPN-1変異体を製造することを含む。本発明にかかるPN-1変異体は、それらの機能性についても説明することができる。重要なのは、本発明のPN-1変異体には、エラスターーゼを阻害できるものがある。これらの一般的なグループの中には、ヘパリンおよび/またはヘパリン様化合物の存在下でエラスターーゼ阻害能力が非常に亢進するPN-1変異体も含まれる。本発明にかかる別のPN-1変異体グループには、PN-1に較べてセリンプロテアーゼを阻害する能力が高いPN-1変異体が含まれる。本発明のPN-1変異体は、ウロキナーゼ、ファクターXaプラスミン、カリクリайн、ファクターXIIa、ファクターXIa、ファクターVa、tpA、エラスターーゼ、カテーテシン、コントラプシンなどのセリンプロテアーゼを阻害するように設計される。本発明の機能的な目的は、一般的に、DNA操作によって、エラスターーゼのようなセリンプロテアーゼを阻害し、ヘ

ー

ゼ、ファクターXaプラスミン、カリクリайн、ファクターXIIa、ファクターXIa、ファクターVa、tpA、エラスターーゼ、カテーテシン、コントラプシンなどのセリンプロテアーゼを阻害するように設計される。本発明の機能的な目的は、一般的に、DNA操作によって、エラスターーゼのようなセリンプロテアーゼを阻害し、ヘ

パリンなどの他の化合物の存在下でこの阻害能が高まる合成物を得ることである。特異的には、酵素をコードするDNAは、DNAの中に特定のセリンプロテアーゼに対する基質をコードするDNAの配列を組み込まれるよう操作される。そして、組み換えられたDNAを、特定のセリンプロテアーゼに対する基質を含む、本発明の変異体を产生するために発現させる。基質が存在するため、該セリンプロテアーゼの活性は、変異体によって特異的に阻害されうる。また一方で、変異体は本来の生物学的活性を保持している。

本発明にかかる変異体の異なる5つの型について、以下でさらに詳細に説明する。

#### P N - 1 変異体 - 活性部位の操作

明確化するために、単一部位の置換を最初に検討（P<sub>1</sub>部位と、次に P<sub>1'</sub> 部位）し、続いて複数の置換を検討する。

#### I型変異体：単一部位突然変異

アルギニン残基は、極性の塩基性アミノ酸である。この極性アルギニンの非極性残基による置換は、得られるセリンプロテアーゼ阻害の程度に劇的な影響を及ぼす。この影響の具体的な例として、アルギニン（ $\alpha$ では345位、 $\beta$ では346位）がイソロイシンで置換されている本化合物N C Y 2 0 1 0が挙げられる（R 3 4 5 I）。このR 3 4 5 I変異体（即ち、イソロイシンがP N - 1  $\alpha$ の345位のアルギニンを置換している）は、ヘパリンが存在しようと存在しまいと、本質的にトロンビン阻害活性を失っている。同時に、このN C Y 2 0 1 0変異体は、好中球エラスターーゼ活性の良好な阻害物質である。未変性の線維芽細胞P N - 1はエラスターーゼに対して阻害効果を持たず、それどころかエラスターーゼの基質であることに注目すると、これは驚くべきことである。

N C Y 2 0 1 0の活性は、セリンプロテアーゼを阻害するプロテアーゼ阻害物質（本発明のP N - 1 変異体のような）での相対有効性が公知の標準により測定

されることを理解して考察すべきである。この標準は、二次会合速度定数（k<sub>as</sub>）であり、（Bieth, J.G., Bull. Euro. Physiopath. Resp. (1980) 16:183-195）に記載され、Scottら (J. Biol. Chem. (1985) 260:7029-7034) により報告

されるが、これらの両文献は二次会合速度定数を開示するため本明細書に参照として組み込まれる。

一般に、特定のプロテアーゼー阻害物質反応の  $k_{\text{ass}}$  値が  $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$  以上であれば、生理学的に有意であると考えられ (TravisとSalveson, Ann. Rev. Biochem., (1983) 52:655-709)、この文献は速度定数の意味を記載するため本明細書に参照として組み込まれる。エラスターーゼ-1-アンチトリプシンやプラスミン- $\alpha$ -2-アンチプラスミンのような多くの生理学的に重要なプロテアーゼー阻害物質反応は、 $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$  以上というような高い速度定数で起こる。トロンビン- $\text{P N}-1$  反応は、同様の高い速度か、又はヘパリンの存在下では更に速い速度で起こる。

未変性  $\text{P N}-1$  は、エラスターーゼの活性を阻害する効果を本質的に持たない。しかし、本発明の R 3 4 5 I 変異体は、セルビンについての新規な生物学的活性、即ち、エラスターーゼを阻害するその能力を明白な形で提供するのみでなく、極めて強力なエラスターーゼ阻害物質を明白な形で提供するものである。この R 3 4 5 I 変異体のこのような程度までエラスターーゼを阻害する能力は、それ自体驚くべき知見であった。しかし、このような強力なエラスターーゼ阻害物質を提供することに加えて、これらの変異体は、ヘパリンの存在下ではエラスターーゼの阻害に更に大きな能力を有することが、予期しない明白な形で見い出された。

本発明の変異体は、エラスターーゼ阻害物質として作用する能力の改善を明瞭に提供することができるだけでなく、ヘパリン、ヘパリン様化合物、又は血管の内皮細胞による裏打ちに通常見い出される他の関連するムコ多糖類の存在下で、これらの活性が部位特異的に大きく増強されるような活性を提供することができる。ヘパリンに加えて、表面及び周囲の細胞外マトリックスに通常見い出される他のヘパリン様化合物のような、ある範囲の硫酸化プロテオグリカン類は、エラスターーゼを阻害する本発明の変異体の能力を増大させるのみでなく、ヘパリンやヘパリン様化合物に対するこれらの変異体の親和性により部位特異的活性を提供する

であろう。

エラスターに及ぼすR 3 4 5 I変異体の阻害効果は、ヘパリンの存在下で約2桁上昇する。肺気腫、先天性 $\alpha$ -1-抗トリプシン欠損症、炎症及び敗血症ショックのようなエラスター関連疾患に罹患している個体を治療するために、極性アルギニン残基をバリンのような非極性残基で置換した「P1」変異体が、ヘパリンで活性化可能な阻害物質として使用できるであろうことは、容易に決定できる。使用することができる非極性残基は、G、A、V、L、I、M、F及びWを含み；更に好適には（バリンに類似した「R」基構造により）G、A、V及びIであり；そして最も好適にはIである。

広い意味で本発明は、強力なエラスター阻害物質として作用することができるとN-1変異体を包含する。更に具体的には、本発明は、エラスター阻害物質として作用し、更にヘパリン及びヘパリン様物質の存在下でこのエラスターを阻害する能力が大きく上昇するPN-1変異体を包含する。更にお具体的には、本発明は、エラスター阻害物質として作用し、かつその変異体はヘパリンの存在下で10倍以上、好適にはヘパリンの存在下で50倍以上、そしてより好適にはヘパリンの存在下で100倍以上エラスターを阻害する能力が上昇する、PN-1変異体を包含する。本発明の有用な調剤は、ヘパリン及び種々の硫酸化多糖類又はプロテオグリカンのようなヘパリン様化合物に加えて、薬剤学的組成物中に処方されるPN-1変異体を含む。ヘパリン様化合物が高度に硫酸化されていて、このため高い負の電荷を与える場合が特に好ましい。

極性アルギニンを置換したバリンのような非極性残基を含む本発明のP1変異体が、エラスターの活性を阻害するこれらのP1変異体の能力を利用して個体を治療するために使用することは既に述べられている。PN-1により阻害されるウロキナーゼやプラスミンのような他のプロテアーゼがヘパリンで活性化可能ではないため、これは非常に驚くべきことである。何ら特定の理論に束縛される意図はないが、陰イオン性であるヘパリンに対する結合を促進するエラスターの陽イオン性のために、本発明のP1変異体はエラスターを阻害するのに有効であるようである。従って、ヘパリンで活性化可能なエラスターの阻害物質を得るために、同様の活性を合理的に期待するために、非極性で、かつ

類似した「R」基を有する他の残基で活性部位が置換される。

#### P N-1変異体の新規な面

P N-1 $\alpha$ 及びP N-1 $\beta$ の配列は、各々図1及び図2に示される。更に、両者の特徴を決める要因は既に述べられている。本開示の前に、P N-1のエラスター $\gamma$ 阻害物質などの本発明の変異体は知られていなかった。更に、任意のこのような変異体が何かの活性を、まして得られた型の活性を提供するかどうかは知られていなかった。実際、エラスター $\gamma$ は未変性P N-1を切断する。この切断がトロンビンや他のプロテアーゼに対してP N-1を不活化する。Arg<sup>346</sup>をIleに変えること(R345I)で、P N-1がエラスター $\gamma$ の更に良好な基質に変化し、これによりP N-1の不活化を早めることは可能であった。本発明は、活性部位が置換されている変異体を提供するのみでなく、このような変異体が活性を有し、この活性は元のP N-1の活性とは実質的に異なることを示す。多くの変異体とこれらの活性が示されたため、活性を有する更に別の変異体も製造することができるであろう。これに連して、P<sub>1</sub>及びP<sub>1'</sub>部位の両方が置換されている変異体を製造することができると仮定される。このような二重置換は、種々の異なる方法で行われる。

このような変異体を製造する1つの方法は、極性残基の代わりの非極性残基を含むような、存在する残基とは実質的に異なる残基で1つの部位を置換し、一方もう1つの部位を、極性であるか非極性であるかに関して、そして類似した「R」基を有することに関して、そこに存在する残基と実質的に類似した残基で置換することである。別 の方法は、両方の部位を元の残基とは実質的に異なる残基で置換することである。変異体を製造するための更に別の可能な手段は、上記で示唆した手法のいずれかを他の部位の置換と組合せて使用することであろう。本明細書の記載を読んだ当業者には、種々のこののような置換が想起可能であろう。重要なことは、生じた変異体が活性を提供し続けることである。活性を提供する変異体の能力は、基質の特異性に依存する。従って、本発明は、所定のプロテアーゼに関する活性を保ち続けるか、又は別のプロテアーゼに関する実質的な活性を獲得する変異体を提供するための、残基の単一、二重及び多重置換を包含することを意図している。

本発明に関連して、活性を有するPN-1変異体は、下記を有する変異体である：（1）tPA、ウロキナーゼ、及び／又は他の関連酵素を阻害することに関する実質的に高い活性；（2）エラスターーゼを阻害することに関する実質的に高い活性；又は最も好適には（3）エラスターーゼを阻害することに関する実質的に高い活性であって、その活性はヘパリンの存在下で更に劇的に上昇する。本発明は、エラスターーゼを阻害するPN-1変異体を製造することが可能であり、更にエラスターーゼを阻害するだけでなく、ヘパリンの存在下でエラスターーゼを阻害する活性が実質的に上昇する変異体を製造することが可能であることを証明したため、このような阻害物質の分野の当業者は、本発明の範囲に含まれることが意図される他の変異体を想到することが可能であろう。

#### 具体的なPN-1変異体

本発明のプロテアーゼネキシン-1変異体の例を、変異体の「特徴」と共に表2に示す。

表1

レコード番号	NCY	突然変異	配列	特徴
1	NCY2000	CHO PN-1	TTAILIAR--SSPP	
2	NCY2001	P1Ala		
3	NCY2002	P1Arg (WT)		
4	NCY2003	P1Asn		
5	NCY2004	P1Asp		
6	NCY2005	P1Cys		
7	NCY2006	P1Gln		
8	NCY2007	P1Glu		
9	NCY2008	P1Gly		
10	NCY2009	P1His		
11	NCY2010	P1Ile		抗エラスター <sup>+</sup>
12	NCY2011	P1Leu		抗エラスター <sup>+</sup>
13	NCY2012	P1Lys		抗プラスミン
14	NCY2013	P1Met		
15	NCY2014	P1Phe		
16	NCY2015	P1Pro		
17	NCY2016	P1Ser		
18	NCY2017	P1Thr		
19	NCY2018	P1Trp		
20	NCY2019	P1Tyr		
21	NCY2020	P1Val		抗エラスター <sup>+</sup>
22	NCY2021	P2Ala (WT)		
23	NCY2022	P2Arg		
24	NCY2023	P2Asn		
25	NCY2024	P2Asp		
26	NCY2025	P2Cys		
27	NCY2026	P2Gln		
28	NCY2027	P2Glu		
29	NCY2028	P2Gly		高反応速度
30	NCY2029	P2His		
31	NCY2030	P2Ile		
32	NCY2031	P2Leu		
33	NCY2032	P2Lys		
34	NCY2033	P2Met		
35	NCY2034	P2Phe		
36	NCY2035	P2Pro		高反応速度
37	NCY2036	P2Ser		
38	NCY2037	P2Thr		
39	NCY2038	P2Trp		
40	NCY2039	P2Tyr		
41	NCY2040	P2Val		
42	NCY2041	P3Ala		
43	NCY2042	P3Arg		
44	NCY2043	P3Asn		
45	NCY2044	P3Asp		
46	NCY2045	P3Cys		
47	NCY2046	P3Gln		

レコード番号	NCY	突然変異	配列	特徴
48	NCY2047	P3Glu		
49	NCY2048	P3Gly		
50	NCY2049	P3His		
51	NCY2050	P3Ile (WT)		
52	NCY2051	P3Leu		
53	NCY2052	P3Lys		
54	NCY2053	P3Met		
55	NCY2054	P3Dha		
56	NCY2055	P3Pro		
57	NCY2056	P3Ser		
58	NCY2057	P3Thr		
59	NCY2058	P3Trp		
60	NCY2059	P3Tyr		
61	NCY2060	P3Val		
62	NCY2101	P1'Ala		
63	NCY2102	P1'Arg		
64	NCY2103	P1'Asn		
65	NCY2104	P1'Asp		
66	NCY2105	P1'Cys		
67	NCY2106	P1'Gln		
68	NCY2107	P1'Glu		
69	NCY2108	P1'Gly		
70	NCY2109	P1'His		
71	NCY2110	P1'Ile		抗 Xa因子
72	NCY2111	P1'Leu		
73	NCY2112	P1'Lys		
74	NCY2113	P1'Met		
75	NCY2114	P1'Phe		
76	NCY2115	P1'Pro		
77	NCY2116	P1'Ser (WT)		
78	NCY2117	P1'Thr		抗 Xa因子
79	NCY2118	P1'Trp		
80	NCY2119	P1'Tyr		
81	NCY2120	P1'Val		

上記例 1～81 は、P N-1 の活性部位内の異なる部位の置換を表す。例えば

レコード番号 2～21 は、P N-1 の P1 位の置換を表す。「WT」の表示は、

C H O 細胞により產生される天然の又は野生型の配列を示すために提供される。

本開示から明らかなように、これらの例は、活性部位内の各位置で 20 アミノ酸

全部の置換を受けてよく、即ち、部位指向性突然変異誘発を用いて、P1、P2、

P3、P4、P1'、P2'、P3'、及び P4' 位に、全 20 個の天然アミノ酸が置

換されてよい。

部位指向性突然変異誘発を用いて、個々の I 型変異体を製造することができる

。しかし同時に大量の I 型変異体を製造することもできる。例えば全 20 個の天

然アミノ酸が全 8 つの位置で置換している、6 400 万の異なる変異体を同時に

製造することができる。このような製造は、1993年6月29日発行の米国特許第5,223,409号に開示されたファージディスプレイ合成方法 (phage display synthesis methodology) を用いて行うことができる。更に、1991年4月23日発行の米国特許第5,010,175号に開示された化学合成方法を使用してこのような変異体の大量混合物を製造することができる。次いで米国特許第5,223,409号に開示されたような異なる型のスクリーニング法を使用して特定の活性を決定するために変異体をスクリーニングすることができる。

#### I型変異体の試験

変異体をプロテアーゼ群と比較し、異なるプロテアーゼに対するこれらの二次速度定数を測定することにより、本発明の任意の変異体を試験することができる。このような試験は例示数のI型変異体で実施され、結果は表1A～1Iに記載される。

表1A  
野生型(CHO PN-1)

<u>プロテアーゼ</u>	<u>二次速度定数(M<sup>-1</sup>S<sup>-1</sup>)</u>
1) トロンビン	5.98 X 10 <sup>6</sup>
2) プラスミン	1.28 X 10 <sup>5</sup>
3) プラスミン(hp)	4.51 X 10 <sup>6</sup>
4) Xa因子	7.45 X 10 <sup>3</sup>
5) Xa因子(hp)	4.85 X 10 <sup>4</sup>
6) ウロキナーゼ	1.49 X 10 <sup>6</sup>
7) ウロキナーゼ(hp)	3.30 X 10 <sup>5</sup>
8) カリクレイン	2.50 X 10 <sup>5</sup>
9) カテプシンG	<100
10) 活性化プロテインC	1.42 X 10 <sup>4</sup>
11) 活性化プロテインC(hp)	1.96 X 10 <sup>6</sup>
12) エラスターーゼ	<100

(hp)は、ヘパリン10μg/mlの存在下であることを示す。

表1B

## 大腸菌(PN-1)

## NCY2002

<u>プロテアーゼ</u>	<u>二次速度定数(M<sup>-1</sup>S<sup>-1</sup>)</u>
1) トロンビン	5.99 X 10 <sup>5</sup>
2) プラスミン	3.44 X 10 <sup>5</sup>
3) プラスミン(hp)	3.98 X 10 <sup>5</sup>
4) Xa因子	4.82 X 10 <sup>5</sup>
5) Xa因子(hp)	2.48 X 10 <sup>4</sup>
6) ウロキナーゼ	2.41 X 10 <sup>5</sup>
7) ウロキナーゼ(hp)	2.35 X 10 <sup>5</sup>
8) カリクレイン	6.30 X 10 <sup>4</sup>
9) カテプシンG	<100
10) 活性化プロテインC	8.56 X 10 <sup>2</sup>
11) 活性化プロテインC(hp)	2.00 X 10 <sup>5</sup>
12) エラスターーゼ	<100

(hp)は、ヘパリン10μg/mlの存在下であることを示す。

表1C  
PN-1(P<sub>2</sub>Gly)  
NCV2028

プロテアーゼ	<u>二次速度定数(M<sup>-1</sup>S<sup>-1</sup>)</u>
1) トロンビン	5.32 X 10 <sup>4</sup>
2) プラスミン	5.52 X 10 <sup>4</sup>
3) プラスミン(hp)	6.75 X 10 <sup>4</sup>
4) Xa因子	9.43 X 10 <sup>3</sup>
5) Xa因子(hp)	5.54 X 10 <sup>4</sup>
6) ウロキナーゼ	1.13 X 10 <sup>5</sup>
7) ウロキナーゼ(hp)	<100
8) カリクレイン	3.24 X 10 <sup>4</sup>
9) カテプシンG	<100
10) 活性化プロテインC	<100
11) 活性化プロテインC(hp)	1.61 X 10 <sup>5</sup>
12) エラスターーゼ	----

(hp)は、ヘパリン10μg/mlの存在下であることを示す。

表1D  
PN-1(P<sub>2</sub>Pro)  
NCY2035

<u>プロテアーゼ</u>	<u>二次速度定数(M<sup>-1</sup>S<sup>-1</sup>)</u>
1) トロンビン	1.92 X 10 <sup>4</sup>
2) プラスミン	8.48 X 10 <sup>3</sup>
3) プラスミン(hp)	1.58 X 10 <sup>4</sup>
4) Xa因子	1.41 X 10 <sup>2</sup>
5) Xa因子(hp)	7.33 X 10 <sup>2</sup>
6) ウロキナーゼ	<100
7) ウロキナーゼ(hp)	<100
8) カリクレイン	<100
9) カテプシンG	<100
10) 活性化プロテインC	<100
11) 活性化プロテインC(hp)	1.39 X 10 <sup>5</sup>
12) エラスターーゼ	----

(hp)は、ヘパリン10μg/mlの存在下であることを示す。

**表1E**  
**PN-1(P,Val)**  
**NCY2020**

<u>プロテアーゼ</u>	<u>二次速度定数(M<sup>-1</sup>S<sup>-1</sup>)</u>
1) トロンビン	<100
2) プラスミン	----
3) プラスミン(hp)	----
4) Xa因子	----
5) Xa因子(hp)	----
6) ウロキナーゼ	----
7) ウロキナーゼ(hp)	----
8) カリクレイン	<100
9) カテプシンG	<100
10) 活性化プロテインC	----
11) 活性化プロテインC(hp)	----
12) エラスターーゼ	1.20 X 10 <sup>6</sup>

(hp)は、ヘパリン10μg/mlの存在下であることを示す。

表1F  
PN-1(P, Ile)  
NCY2010

<u>プロテアーゼ</u>	<u>二次速度定数(M<sup>-1</sup>S<sup>-1</sup>)</u>
1) トロンビン	<100
2) プラスミン	----
3) プラスミン(hp)	----
4) Xa因子	----
5) Xa因子(hp)	----
6) ウロキナーゼ	----
7) ウロキナーゼ(hp)	----
8) カリクリain	<100
9) カテプシンG	<100
10) 活性化プロテインC	----
11) 活性化プロテインC(hp)	----
12) エラスターーゼ	4.15 X 10 <sup>6</sup>

(hp)は、ヘモゲリン10μg/mlの存在下であることを示す。

表1G

PN-1(P,Leu)NCY2011

<u>プロテアーゼ</u>	<u>二次速度定数(M<sup>-1</sup>S<sup>-1</sup>)</u>
1) トロンビン	<100
2) プラスミン	----
3) プラスミン(hp)	----
4) Xa因子	----
5) Xa因子(hp)	----
6) ウロキナーゼ	----
7) ウロキナーゼ(hp)	----
8) カリクリain	<100
9) カテプシンG	<100
10) 活性化プロテインC	----
11) 活性化プロテインC(hp)	----
12) エラスターーゼ	1.65 X 10 <sup>6</sup>

(hp)は、ヘパリン10μg/mlの存在下であることを示す。

表II  
PN-1(P,Lys)  
NCY2012

<u>プロテアーゼ</u>	<u>二次速度定数(M<sup>-1</sup>S<sup>-1</sup>)</u>
1) トロンビン	2.59 X 10 <sup>4</sup>
2) プラスミン	1.01 X 10 <sup>5</sup>
3) プラスミン(hp)	1.51 X 10 <sup>4</sup>
4) Xa因子	<100
5) Xa因子(hp)	----
6) ウロキナーゼ	1.16 X 10 <sup>4</sup>
7) ウロキナーゼ(hp)	----
8) カリクリein	<100
9) カテプシンG	<100
10) 活性化プロテインC	<100
11) 活性化プロテインC(hp)	3.02 X 10 <sup>4</sup>
12) エラスターーゼ	----

(hp)は、ヘパリン10μg/mlの存在下であることを示す。

**表II**  
**PN-1(P, Met)**  
**NCY2013**

プロテアーゼ	二次速度定数( $M^{-1}S^{-1}$ )
1) トロンビン	----
2) プラスミン	----
3) プラスミン(hp)	----
4) Xa因子	----
5) Xa因子(hp)	----
6) ウロキナーゼ	----
7) ウロキナーゼ(hp)	----
8) カリクレイン	4.81 X 10 <sup>4</sup>
9) カテプシンG	<100
10) 活性化プロテインC	----
11) 活性化プロテインC(hp)	----
12) エラスターーゼ	<100

(hp)は、ヘパリン10 $\mu g/ml$ の存在下であることを示す。

#### II型変異体：セルビン活性部位の交換

本発明のII型変異体は、I型変異体と同様の方法で製造される。しかしPN-1の活性部位は、別のプロテアーゼ、好適には別のセルビンの活性部位の配列に適合するような方法で修飾される。本発明のII型変異体の例は、下記のものを含む：

表2

NCY番号	セルビン	$E_1$	$E_2$	$E_3$	$E_4$	$E'_1$	$E'_2$	$E'_3$	$E'_4$
	プロテアーゼ ネキシシン-1	Lau- Ile- Ala- Arg		Ser- Ser-	Pro- Pro				
2203	PAI-1	Val- Ser- Ala- Arg		Met- Ala-	Pro- Glu				
2204	PAI-2	Met- Thr- Gly- Arg		Thr- Gly-	His- Gly	◎			
2205	PAI-3*	Phe- Thr- Phe- Arg		Ser- Ala-	Arg- Lau				
2201	ATIII	Ile- Ala- Gly- Arg		Ser- Leu-	Asn- Pro				
2206	$\alpha$ 2-アンチ プラスミン	Ala- Met- Ser- Arg		Met- Ser-	Leu- Ser				
2207	C1- インヒビター	Ser- Val- Ala- Arg		Thr- Leu-	Leu- Val				
2208	カリクレイン B P	Ile- Lau- Ser- Arg		Arg- Thr-	Ser- Leu	OR			
2209	(ラット)	Phe- Arg- Ile- Leu		Ser- Arg-	Arg- Thr				
2210	$\alpha$ 1AT Ala-	Ile- Pro- Met		Ser- Ile-	Pro- Pro				
2211	$\alpha$ 1AT Glu-	Lys- Ala- Thr		Ser- Lys-	Tyr- Gln				
	関連								
2212	$\alpha$ 1AC Leu-	Lau- Ser- Ala		Lau- Val-	Glu- Thr	OR			
	Ile-	Thr- Lau- Leu		Ser- Ala-	Leu- Val				
2202	HCII Phe-	Met- Pro- Leu		Ser- Thr-	Glu- Val				
2213	ウロキナーゼ インヒビター	Met- Thr- Gly- Arg		Thr- Gly-	His- Gly	◎			

◎は、好適には後に-Gly-Proが続く配列を示す。

下線の残基は、天然PN-1配列とは異なることを示す。

この表は、例を表し、本発明のII型変異体の限定と考えてはならない。

I型変異体に関する上述のものと同じ方法を使用してII型変異体を製造することができる。更に、上記引用特許（本発明に参照として組み込まれる）に開示された方法を使用してII型変異体を製造することができる。この方法は、最初に別性部位のアミノ酸配列を決定し、この異なるセルビンの活性を試験した後に、天

然のPN-1に比較して、特定のかつ目的の変化した活性を有するII型変異体を製造することができる。

#### II型変異体の試験

上の通り、本発明の全ての変異体はプロテアーゼ群に対するこれらの二次速度定数を測定することにより試験することができる。I型変異体と同様に、代表する数のII型変異体で試験を行い、得られた結果を下記表2A及び2Bに示す。

表2A

2201 (AT III)

プロテアーゼ	二次速度定数( $M^{-1}S^{-1}$ )
1) トロンビン	$1.69 \times 10^4$
2) プラスミン	$2.74 \times 10^4$
3) プラスミン(hp)	$4.45 \times 10^4$
4) Xa因子	$4.21 \times 10^4$
5) Xa因子(hp)	$2.98 \times 10^4$
6) ウロキナーゼ	<100
7) ウロキナーゼ(hp)	----
8) カリクレイン	$9.49 \times 10^4$
9) カテプシンG	<100
10) 活性化プロテインC	<100
11) 活性化プロテインC(hp)	----
12) エラスターーゼ	----

(hp)は、ヘパリン $10\mu g/ml$ の存在下であることを示す。

表2B  
2202 (HC II)

<u>プロテアーゼ</u>	<u>二次速度定数(M<sup>-1</sup>S<sup>-1</sup>)</u>
1) トロンビン	3.36 X 10 <sup>8</sup>
2) プラスミン	<100
3) プラスミン(hp)	----
4) Xa因子	<100
5) Xa因子(hp)	----
6) ウロキナーゼ	<100
7) ウロキナーゼ(hp)	----
8) カリクレイン	<100
9) カテプシンG	4.60 X 10 <sup>5</sup>
10) 活性化プロテインC	<100
11) 活性化プロテインC(hp)	----
12) エラスターーゼ	<100

(hp)は、ヘパリン10μg/mlの存在下であることを示す。

N C Y 2 2 0 2 (特にヘパリンの存在下で) の活性は、両者ともカテプシンGを阻害するがエラスターーゼは阻害しないという点でN C Y 2 3 2 2 の活性と幾分類似している。これは同程度の基質特異性のため全く予期しないことである。

#### III型変異体：基質配列の組み込み

本発明のIII型変異体は、最初にプロテアーゼの基質配列を決定することにより製造される。公知で本発明に関する有用であろう幾つかのプロテアーゼの基質配列を下記表3 Aに示す。

表3A

プロテアーゼ	基質配列
トロンビン	D-Phe-Pip-Arg-pNA Ts-Gly-Pro-Arg-pNA
X a 因子	bz-Ile-Glu( $\gamma$ OR)-Gly-Arg-pNA cbo-D-Arg-Gly-Arg-pNA
X I a 因子	Glu-Pro-Arg-pNA
プラスミン	(D/L)-Val-Leu-Lys-pNA D-Val-Phe-Lys-pNA Ts-Gly-Pro-Lys-pNA Glu-Phe-Lys-pNA
ウロキナーゼ	Glu-Gly-Arg-pNA Bz-Ala-Gly-Arg-pNA
tPA	(D/L)-Ile-Pro-Arg-pNA
C 1 -エステラーゼ	z-Val-Gly-Arg-pNA
カリクレイン	(D/Bz)-Pro-Phe-Arg-pNA
好中球エラスターーゼ	Glu-Pro-Val-pNA Ala-Ala-Pro-Val-pNA
カテプシン G	Ala-Ala-Pro-Phe-pNA Ala-Ala-Pro-Leu-pNA
肺エラスターーゼ	Ala-Ala-Ala-pNA

$k_{cat}$  及び  $k_{\mu}$ により決定される最良の人工小分子ペプチド基質（即ち、A I a - A l a - P r o - P h e - p N A）を測定することにより、又は天然タンパク質基質（例えはトロンビンに対するフィブリノーゲン）の配列を検討することにより、他の基質配列を測定することができる。

プロテアーゼが結合するアミノ酸配列（即ち、その特異的基質配列）の測定後、P N - I の活性部位の全て又は一部を置換するためにその配列を使用する。II型変異体の例は下記のものである：

表3B

レコード番号	N C Y	突然変異	配列	性質
1	NCY2301	XaS	IIEGR---	抗凝固
2	NCY2302	フィブリノーゲン	DPLAGGGGVVR--	トロンビン阻害
3	NCY2303	HMKW	SPPFR-SVQ	カリクレイン阻害
4	NCY2310	FPR	FPR--	トロンビン
5	NCY2311	EPV	EPV--	エラスターーゼ
6	NCY2321	AAPF	AAPF	カテプシンG阻害
7	NCY2322	AAPL	AAPL--	エラスターーゼ
8	NCY2323	AAPV	AAPV--	エラスターーゼ
9	NCY2324	AAPI	AAPI--	エラスターーゼ

III型変異体の試験

上記表3Bに、具体的なIII型変異体を示す。表3Aに示されるようなプロテアーゼの基質配列がP N-1に含まれる。これらの変異体をプロテアーゼ群に対

して試験した。その結果を表3C～3Jに示す。

表3C

2301 (Xa S)

プロテアーゼ	二次速度定数( $M^{-1}S^{-1}$ )
1) トロンビン	<100
2) プラスミン	$2.45 \times 10^4$
3) プラスミン(hp)	$2.54 \times 10^4$
4) Xa因子	$1.37 \times 10^3$
5) Xa因子(hp)	$6.83 \times 10^3$
6) ウロキナーゼ	$5.71 \times 10^3$
7) ウロキナーゼ(hp)	----
8) カリクレイン	<100
9) カテプシンG	<100
10) 活性化プロテインC	<100
11) 活性化プロテインC(hp)	----
12) エラスターーゼ	----

(hp)は、ヘパリン $10\mu g/ml$ の存在下であることを示す。

表3D  
2303 (HWWK)

プロテアーゼ	二次速度定数( $M^{-1}S^{-1}$ )
1) トロンビン	$2.27 \times 10^3$
2) プラスミン	<100
3) プラスミン(hp)	----
4) Xa因子	<100
5) Xa因子(hp)	----
6) ウロキナーゼ	<100
7) ウロキナーゼ(hp)	----
8) カリクレイン	<100
9) カテプシンG	<100
10) 活性化プロテインC	<100
11) 活性化プロテインC(hp)	----
12) エラスターーゼ	----

(hp)は、ヘパリン $10\mu g/ml$ の存在下であることを示す。

表3E  
2310 (FPR)

<u>プロテアーゼ</u>	<u>二次速度定数(M<sup>-1</sup>S<sup>-1</sup>)</u>
1) トロンビン	4.13 X 10 <sup>4</sup>
2) プラスミン	5.12 X 10 <sup>4</sup>
3) プラスミン(hp)	1.32 X 10 <sup>6</sup>
4) Xa因子	3.30 X 10 <sup>2</sup>
5) Xa因子(hp)	----
6) ウロキナーゼ	5.30 X 10 <sup>8</sup>
7) ウロキナーゼ(hp)	----
8) カリクレイン	<100
9) カテプシンG	<100
10) 活性化プロテインC	<100
11) 活性化プロテインC(hp)	4.74 X 10 <sup>6</sup>
12) エラスターーゼ	----

(hp)は、ヘパリン10μg/mlの存在下であることを示す。

表2F  
2321 (AAPF)

<u>プロテアーゼ</u>	<u>二次速度定数(M<sup>-1</sup>S<sup>-1</sup>)</u>
1) トロンビン	7.02 X 10 <sup>3</sup>
2) プラスミン	<100
3) プラスミン(hp)	----
4) Xa因子	<100
5) Xa因子(hp)	----
6) ウロキナーゼ	----
7) ウロキナーゼ(hp)	----
8) カリクレイン	<100
9) カテプシンG	<100
10) 活性化プロテインC	----
11) 活性化プロテインC(hp)	----
12) エラスターーゼ	<100

(hp)は、ヘパリン10μg/mlの存在下であることを示す。

表36  
2322 (AAPL)

<u>プロテアーゼ</u>	<u>二次速度定数(M<sup>-1</sup>S<sup>-1</sup>)</u>
1) トロンビン	----
2) プラスミン	----
3) プラスミン(hp)	----
4) Xa因子	----
5) Xa因子(hp)	----
6) ウロキナーゼ	----
7) ウロキナーゼ(hp)	----
8) カリクレイン	<100
9) カテプシンG	4.0 X 10 <sup>4</sup>
10) 活性化プロテインC	----
11) 活性化プロテインC(hp)	----
12) エラスターーゼ	<100

(hp)は、ヘパリン10μg/mlの存在下であることを示す。

表3H  
2324 (AAPI)

プロテアーゼ	二次速度定数( $M^{-1}s^{-1}$ )
1) トロンビン	----
2) プラスミン	----
3) プラスミン(hp)	----
4) Xa因子	----
5) Xa因子(hp)	----
6) ウロキナーゼ	----
7) ウロキナーゼ(hp)	----
8) カリクレイン	<100
9) カテプシンG	<100
10) 活性化プロテインC	----
11) 活性化プロテインC(hp)	----
12) エラスターーゼ	<100

(hp)は、ヘパリン $10\mu g/ml$ の存在下であることを示す。

表31  
2323 (AAPV)

<u>プロテアーゼ</u>	<u>二次速度定数(M<sup>-1</sup>S<sup>-1</sup>)</u>
1) トロンビン	----
2) プラスミン	----
3) プラスミン(hp)	----
4) Xa因子	----
5) Xa因子(hp)	----
6) ウロキナーゼ	----
7) ウロキナーゼ(hp)	----
8) カリクレイン	<100
9) カテプシンG	<100
10) 活性化プロテインC	----
11) 活性化プロテインC(hp)	----
12) エラスターーゼ	<100

(hp)は、ヘパリン10μg/mlの存在下であることを示す。

表3J  
2311 (EPV)

<u>プロテアーゼ</u>	<u>二次速度定数(M<sup>-1</sup>S<sup>-1</sup>)</u>
1) トロンビン	<100
2) プラスミン	----
3) プラスミン(hp)	----
4) Xa因子	----
5) Xa因子(hp)	----
6) ウロキナーゼ	----
7) ウロキナーゼ(hp)	----
8) カリクレイン	<100
9) カテプシンG	<100
10) 活性化プロテインC	----
11) 活性化プロテインC(hp)	----
12) エラスターーゼ	<100

(hp)は、ヘパリン10μg/mlの存在下であることを示す。

#### IV型変異体

本発明のIV型変異体は、アミノ酸配列が天然タンパク質と同一であるか又はそれらとは異なる他の全ての変異体とは全く異なる。IV型変異体は、生物学的安定性の向上が望まれる時に、一般に任意のタンパク質、タンパク質断片、又はペプチドへのPEGの共有結合（即ち、カップリング）により生成することができる。この内特に興味あるものは、治療上の適用に有用な、セリンプロテアーゼ阻害タンパク質、成長因子、及びサイトカインのようなタンパク質、タンパク質断片、及びペプチドである。タンパク質PN-1、ヒト成長ホルモン(hGH)、エリトロポエチン(EPO)、及びアンチトロンビン-III(ATIII)は特に興味深い。本発明の方法を使用してIV型変異体を作成するために修飾することができる、興味ある具体的なタンパク質の例、及びタンパク質群の例を表4Aに示す。

表 4 A

IV型変種の作成のためのタンパク質と蛋白群の例

蛋白群の例	
インターフェロン-2 $\alpha$ A	インスリン様増殖因子
インターフェロン-2 $\alpha$ B	インスリン
ヒト成長ホルモン	トランスフォーミング増殖因子
エリスロポエチン	毛様トランスフォーミング因子
トロンボポエチン	脳由来神経因子
IL-1	インスリントロピン
IL-2	グリア由来神経因子
IL-1 RA	組織プラスミノゲン アクチベーター
スーパーオキシドジスマスター	ウロキナーゼ
カタラーゼ	ストレプトキナーゼ
線維芽細胞増殖因子 (FGR) (酸性又は塩基性)	ヘモグロビン
神経成長因子	アデノシンデアミダーゼ
顆粒球マクロファージコロニー 刺激因子	ウシ成長ホルモン
顆粒球コロニー刺激因子	カルトキシン
血小板由来増殖因子	殺菌性/透過性亢進蛋白
L-アスパラギナーゼ	アルギナーゼ
ウリカーゼ	フェニルアラニン
γ-インターフェロン	アンモンニアリアーゼ

表4A(続き)

蛋白群の例	
プロテアーゼ	下垂体ホルモン
プロテアーゼ阻害物質	成長因子
サイトカイン	ソマトメジン
ケモカイン	免疫グロブリン
性腺刺激物質	インターロイキン
ケモタクチン	インターフェロン
脂質結合蛋白	アレルゲン

\* G D N F は、プロテアーゼネキシン-1 (P N - 1) と同じタンパク質である。

IV型変異体は、ポリエチレン glycole をタンパク質のシステイン残基のチオ基に付加することにより製造される。タンパク質に付加される P E G 残基は、分子量で約 2 0 0 ~ 2 0 0 0 0 分子量の範囲であろう。好適には P E G 残基は、約 1 0 0 0 ~ 8 0 0 0 分子量、より好適には約 3 2 5 0 ~ 5 0 0 0 、最も好適には 5 0 0 0 分子量である。

タンパク質にポリエチレン glycole を付加する一般の方法は、1 9 7 9 年 1 月 1 8 日発行の米国特許第4,179,337号に開示される（タンパク質にポリエチレン glycole を付加する方法を開示するため本明細書に参照として組み込まれる）。更に、ポリエチレン glycole を付加する他の方法は、1 9 9 2 年 6 月 1 6 日発行の米国特許第5,122,614号に開示され、これもまたタンパク質にポリエチレン glycole を付加する方法を開示するため本明細書に参照として組み込まれる。

本発明者らは、タンパク質中のシステイン残基にポリエチレン glycole を付加することにより、新規修飾タンパク質を製造することができるこことを発見した。好適には、このタンパク質は、普通グリコシル化されている位置でシステイン残基にポリエチレン glycole を付加することにより修飾される。別の好適な実施

様においては、普通グリコシル化（例えば、N-アセチル化）されている位  
置にシステイン残基を付加し、この付加したシステイン残基のチオ基にポリエチ  
レンゲリコールを付加する。更に、関心あるタンパク質が構造上関連したタンパ  
ク質群の一員であるならば、他の任意の一員のグリコシル化部位を関心あるタン  
パク質上のアミノ酸に一致させ、このアミノ酸をポリエチレンゲリコールの付加  
のためのシステインに変化させることができる。或は、関心あるタンパク質又は  
関連タンパク質について結晶構造が決定されると、活性部位又は結合部位から遠  
く離れた表面残基をポリエチレンゲリコールの付加のためのシステインに変化さ  
せることができる。

また、システイン残基のチオ基に他の基を付加することができる見い出  
された。例えば、システイン残基のチオ基にビオチンを付加することによりタン  
パク質をビオチン化することができる。IV型変異体の例は、下記のものである：

表4

レコード番号	NCY	突然変異	配列	特徴
1	NCY2601	PEG-PN1	lys- 修飾	長い半減期
2	NCY2611	Biotin-PN1	lys- 修飾	候出／カップリング
3	NCY2621	PEG-PN1	cys- 修飾	長い半減期
4	NCY2631	Biotin-PN1	cys- 修飾	候出／カップリング

上記例の中で、レコード番号1及び2は、ポリエチレンゲリコール又はビオチン  
がペプチドのリシンの位置に付加している当該分野で公知の一般的型のものであ  
る。しかし、レコード番号3及び4は、各々ポリエチレンゲリコール又はビオチ  
ンがシステイン基で結合している例である。このようなものの重要性は更に以下  
に記載される。

タンパク質へのポリエチレンゲリコール（PEG）の付加は、血清半減期を上  
昇させ、免疫原性及び抗原性を低下させる一般的な方法である。Nucciらは、ア  
デノシンデアミダーゼ、急性リンパ球性白血病の治療のためのL-アスパラギ  
ナーゼ、抗癌剤及び抗ウイルス剤としてのインターフェロンアルファ2b（IF

N- $\alpha$  2 b)、抗癌剤としてのスーパーオキシドジスマターゼ、ストレプトキナーゼ、t P A、ウロキナーゼ、ウリカーゼ、ヘモグロビン、インターロイキン、インターフェロン、T G F- $\beta$ 、E G F、及び他の成長因子を含む、P E G の付加により修飾された幾つかのタンパク質を記載している (Nucciら, 1991, Adv. Drug Delivery Rev. 6:133-151)。

典型的には、このP E G残基の付加によるタンパク質の修飾は、タンパク質の表面上のリジン残基と反応する官能基でP E Gを活性化することを伴う。このタンパク質の修飾を完全に進めると、タンパク質の活性は通常消失する。現在の修飾方法は、部分的なタンパク質のP E G化のみを行う。通常これにより活性がわずか50%消失し、血清半減期が大きく上昇するため、目的の活性を得るために要するタンパク質の全用量は低くなる。

部分修飾の避けられない結果は、タンパク質当りのP E G基（リジン残基に結合しているP E G）数の統計的分布があることである。また、表面のリジン残基のランダムな利用もある。例えば、アデノシンデアミダーゼが最適に修飾される時、このタンパク質にはタンパク質当り約14個のP E Gがあり、個々のタンパク質当りの実際のP E Gの分布は広く、実際に使用されるリジン残基の分布は広い時、50%の活性の消失がある。

P E G修飾の初期的研究は、シアヌル酸クロリドでP E Gを活性化してタンパク質とカップリングすることに依存していた。この方法には、幾つかの不利な点があり、中で最も顕著なものはシアヌル酸クロリドの毒性と活性化の消失である。最近になって、P E G化反応に伴う化学物質の毒性を低下させる著しい進歩があった。Zalipskyら (Zalipsky, S., Selzer, R. & Nho, K. (1991)ポリマー性薬剤及び薬剤送達システム (Polymeric Drugs and Drug Delivery Systems), ACS.) は、遊離リジン残基を介してタンパク質と安定なカルバミン酸結合を生成するためのP E Gのスクシンイミジル炭酸塩の使用を記載している。遊離リジンを

介するP E Gによるタンパク質の修飾のために幾つか他の方法があるが、それぞれタンパク質の部分的でランダムな修飾に関連した問題、及びリジン残基が重要

である場合に活性の消失の可能性に関連する問題がある。

P E G化法の技術の現状は、反応をより特異的に行なうことができれば大きく改善されるであろう。例えば、P E G化の間タンパク質の反応領域をブロックすることができれば、このタンパク質は完全に修飾後でさえ全活性を保持することが期待される。この方法は費用がかかり不便であることが理解される（この修飾が、活性部位が保護されている親和性精製工程で行われ、タンパク質が全て一工程で精製される場合を除いて）。ある場合には活性部位領域をブロックすることにより、回復不可能な活性の消失を招くため、この方法は使用されえない。

別の代替法は、H i s、T r p、C y s、A s p、G l uなどのような他の残基を、活性が消失しないような方法でP E G修飾することである。これらの残基の多くは活性部位かその近くにあるか、又はこれらの残基は表面に存在しないか、血清半減期に著しく影響を与えるのに充分な数で表面に存在しないか、又は修飾の化学反応が標的の残基に対して充分に特異的でないか、この化学反応が活性の消失なしにはタンパク質が耐えられない程度であるかということが、予想されるか又は可能性がある。

最も望ましい状況は、反応性で容易にかつ特異的に修飾でき、そして活性部位領域から遠く離れているあるアミノ酸の表面分布が存在することであろう。システインは活性部位かその近くで使用されることはある（システインプロテアーゼを除いて）、修飾の化学反応はよく確立しているため、システインはこのような修飾に理想的な候補である。マレイミド-P E Gが恐らく最も有用であるが、他の化学物質も特異的システム修飾のために利用可能である。部位指向性突然変異誘発を使用して、活性部位領域とは遠く離れた表面に新規システイン残基を付加することができる。X線結晶構造が公知であれば、この方法は最も便利にかつ容易に行なうことができる。

このタンパク質工学の手法をもってしても、充分に安定性を増大させるために、どの表面残基をシステインに変えるか、そして幾つのP E G修飾部位を付加すべきかということは、容易に推察できない。多くの手法があり、それにより、2

以上の独立の単一部位システイン突然変異体を生成させ、各々独立にPEG化し、残存活性について各々解析する。充分な活性を保持している突然変異タンパク質類を、複数のPEG付加部位を有する1つのタンパク質を作成するために結合させることができる。

三次元構造の知識が必要でない利点を有し、また悪い部位を取り除く進化の選択力を利用する、良好なPEG付加部位を同定するための別の手法がある。安定性を促進し、血清半減期を上昇させるために、自然は、分泌タンパク質の表面にグリコシル化残基を付加することを選択した。例えば、周知のN-アセチルグルコサミンの部分である時アスパラギン残基はグリコシル化される(N-P-T/S-P!)。これらAsn残基のシステインによる置換、これに続くシステイン特異的PEG化は、活性の消失が最小で血清半減期が著しく上昇したタンパク質が得られることを予期させる。今まで、この方法はin vitroのグリコシル化に最も近いことであり、不適切な糖残基によるグリコシル化が肝臓による血清からのクリアランスを増大させ、一方PEG残基はむしろ不活性であると予期されるため、幾つかの点ではそれ以上である。

高度のPEG修飾が必要とされ、修飾すべきタンパク質が構造相関タンパク質群の一員であるならば、同じタンパク質群の他のタンパク質はしばしば、関心あるタンパク質には見い出されないグリコシル化部位を1つ以上有する。これらの「新規」潜在部位が合理的に保存される領域にあるならば(即ち、挿入の部分がないか、又は異なる構造を有する程に異なってはいない配列)、Asnと同等な残基のシステインによる置換、これに続くPEG化により、活性の有意な消失なく高度にPEG修飾されたタンパク質を得られることが予期される。

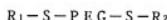
更に高度のPEG修飾が必要であるならば、他の溶媒に接する残基をシステインに変えて、生じたタンパク質をPEG化することができる。適切な残基は、当業者には容易に決定できる。例えば、関心あるタンパク質又は関連するタンパク質の三次元構造が利用可能であれば、溶媒に接するアミノ酸は容易に同定される。また、Lys、Arg、Asp及びGluのような荷電したアミノ酸は、ほぼ例外なくタンパク質の表面に見い出される。これらの1つ、2つ又は多くの残基のシステインによる置換は、PEG付加の別の部位を与える。更に、抗体に認識

さ

れる未変性タンパク質中のアミノ酸配列は、通常タンパク質の表面にある。溶媒に接するアミノ酸を決定するためのこれらの及び他の方法は、当業者にはよく知られている。

またPEGによるタンパク質の修飾は、生物学的安定性が上昇したタンパク質、断片、及び／又はペプチドの二量体及び多量体複合体を生成するために使用することができる。これらの本発明の二量体及び多量体タンパク質は、天然の二量体又は多量体タンパク質であってもよい。例えば、この二量体又は多量体は、タンパク質の架橋サブユニット（例えばヘモグロビン）よりもよい。或は、この二量体及び多量体タンパク質は、通常架橋していない2つのタンパク質よりもよい（例えば、架橋EPOタンパク質の二量体）。

本発明の二量体タンパク質は、このタンパク質を、2つのタンパク質反応性残基を有するPEGよりなる試薬である（マレイミド） $-R_1-PEG-R_2-$ と反応させることにより製造することができる。二官能性PEG残基によるこのPEG化反応により、一般式：



（式中、 $R_1$ 及び $R_2$ は、同一又は異なるタンパク質を表してよく；そしてSは、未変性 $R_1$ 又は $R_2$ タンパク質のいずれかに存在するか、又は部位指向性突然変異誘発により導入されたシスティンのチオ基を表す）で示される二量体が生成する。タンパク質 $R_1$ 及び $R_2$ は、各々サイズが、約6～1,000アミノ酸、好適には約200～400アミノ酸、より好適には40～200アミノ酸に変化してよい。二量体分子中では、 $R_1$ 及び $R_2$ は好適には約100～200アミノ酸である。特に関心のある二量体及び多量体は、分子量約40,000未満である、タンパク質、タンパク質断片及び／又はペプチドよりなるものを含む。

タンパク質が2つ以上のシスティンを含有する（又は含有するように設計された）場合、タンパク質（ $R_1$ 、 $R_2$ 、…… $R_n$ により表される）が同一又は異なる多量体タンパク質を生成することができる。 $R_1$ 、 $R_2$ 、…… $R_n$ により表されるタンパク質は、サイズが、約6～1,000アミノ酸、好適に

は20~400アミノ酸、より好適には40~200アミノ酸に変化してよい。

このような多量体タンパク質は、下記一般式：



(式中、R<sub>1</sub>は、例えば2~20個の遊離システイン、通常5~7個の遊離システインである、複数の遊離システインを有するタンパク質を表す)で示されてよい。R<sub>2</sub>は、R<sub>1</sub>と同一であるか又は異なるタンパク質を表してよい。更に、R<sub>1</sub>に結合した各R<sub>2</sub>タンパク質は、同一タンパク質であっても、又は幾つかの異なるタンパク質を表してもよい。

多量体架橋の程度は、存在する及び／又はタンパク質中に設計されたシステインの数により、及び反応混合物中に使用される(マレイミド)zPEGの濃度により制御ができる。更に、単一のPEG残基を有するタンパク質、及び複合体内のタンパク質間のPEG架橋を有するタンパク質のカップリングの形成のため、タンパク質との同じ反応でマレイミド-PEG+(マレイミド)z-P EG試薬を使用してもよい。少なくとも部分的には未変性タンパク質に比較して増大したサイズのため、生成する二量体又は多量体タンパク質は、未変性タンパク質に比較して半減期が上昇する。このような大きなタンパク質は、小さなタンパク質ほど急速には腎臓により分解されたり循環中から排除されることはない。更に、二量体又は多量体タンパク質の活性又は能力は増大しているかもしれない。

二量体及び多量体タンパク質は、マレイミド-PEG又は(マレイミド)z-PEGとの反応により生成されてよい。本発明の方法を使用する二量体及び／又は多量体複合体形成のためのタンパク質の例は、PN-LPN-1変異体、ヘモグロビン、及びエリトロポエチン(EPO)、更には表4Aに例示される任意のタンパク質又はタンパク質群の任意のタンパク質を含む。好適には本発明の方法により生成されるタンパク質は、ヘモグロビンの「a」及び「b」鎖のPEG化架橋複合体であり、分子間及び／又は分子内架橋を有するヘモグロビンの多量体複合体も本主題の方法により生成される。

一般に、PEG修飾のためのシステイン残基を同定する方法、及び／又は後で

PEGの付加により修飾されるシステインで置換されるアミノ酸残基を同定する方法により、未変性タンパク質のほとんど又は全ての活性を保持することが合理的に予期されるPEG化タンパク質を生成することができる。システインによる修飾及び／又は置換のために選択される部位は、タンパク質の構造に基づき選択

される。即ち、選択される部位は、活性部位には関与しない溶媒に接する残基である。

活性部位の外側に位置する突然変異の影響は、これらがタンパク質の主要な活性を一般に変化させないことで一般に予測可能である。更に、本明細書に記載される構造の突然変異は、タンパク質の溶媒に接する領域内（即ち、タンパク質の「表面」上）であるため、タンパク質分子内の他の残基とは限定された相互作用を有するか又は相互作用がない。即ち、これらの位置の突然変異は、タンパク質内の他の任意のアミノ酸のコンホーメーションに影響する可能性は小さい。

#### V型変異体

本発明のV型変異体は、PN-1に全ての又は断片の別のタンパク質を結合することにより製造される。好適には、PN-1を異なる受容体（即ち、ウロキナーゼ受容体）に局在させるために、ウロキナーゼのようなタンパク質のアミノ末端断片をPN-1に結合する。ウロキナーゼの使用に加えて、tPA、IX因子、X因子、及びプロテインCのようなタンパク質のアミノ末端断片を結合することができる。V型変異体の例は、下記の通りである：

表5

レコード番号	NCY	突然変異	配列	特徴
1	NCY2501	ATF-PN1	ウロキナーゼ	抗転移
2	NCY2502	HSA-PN1	HSA キメラ	長い半減期
3	NCY2503	IgG-PN1	IgG キメラ	長い半減期
4	NCY2504	F9-PN1	第IX因子 キメラ	抗凝固
5	NCY2505	F10-PN1	第IX因子 キメラ	抗凝固
6	NCY2506	APC-PN1	プロテインC キメラ	凝結促進性

本発明のV型変異体は、I、II及びIII型の変異体と同様の方法で製造するこ

とができる。しかし、異なるタンパク質のN-末端断片をP N-1に化学的に結合することにより、このような変異体を製造することが好適である。

V型変異体はまた、両方のタンパク質成分の精製した調製物の化学結合により製造することができる。このような結合は、便利には二官能性架橋剤を使用することにより達成される。このような結合を化学的に確立する方法は、当業者にはよく知られている。この方法で製造される具体的な変異体は、EGF : IX因子 : X因子；及びAPCの任意の1つにPN-1を結合することにより製造される変異体を含む。

本発明のPEG化方法は、一般的方法であることを意図し、このため任意のタンパク質に適用して、溶解性、循環半減期を増大させ、及び／又は免疫原性を低下させることが可能である。

#### V型変異体の試験

本発明のV型変異体は、PN-1が別のタンパク質に共有結合したキメラタンパク質である。上記の同じプロテアーゼ群を使用して本発明のV型変異体の1つを試験した。その結果を以下に示す。

表5A

## 2501 (ATF-PN-1)

<u>プロテアーゼ</u>	<u>二次速度定数(M<sup>-1</sup>S<sup>-1</sup>)</u>
1) トロンビン	5.8 X 10 <sup>5</sup>
2) プラスミン	3.5 X 10 <sup>5</sup>
3) プラスミン(hp)	----
4) Xa因子	----
5) Xa因子(hp)	----
6) ウロキナーゼ	2.3 X 10 <sup>5</sup>
7) ウロキナーゼ(hp)	----
8) カリクレイン	----
9) カテプシンG	----
10) 活性化プロテインC	----
11) 活性化プロテインC(hp)	----
12) エラスターゼ	----

(hp)は、ヘパリン10μg/mlの存在下であることを示す。

用途及び投与

本発明の異なるキメラタンパク質、PN-1変異体及びシステイン-P EG化タンパク質（上述の通り）は、異なる効果を提供する可能性がある。例えば、極性アルギニン残基に置換したバリンといった非極性残基を伴うP<sub>1</sub>変異体は、ヘパリン活性化可能な阻害物質として使用できるだろう。かかる阻害物質は、エラスターゼ関連疾患を患う個体を治療するのに使用できる。このような疾病に制限されるわけではないものの、かかる変異体は、気腫、先天性α-1-抗トリプシン不全症、炎症、関節炎及び敗血症性ショックを治療するのに使用できる。

本発明のキメラタンパク質、PN-1変異体及び／又はこれらのタンパク質のシステイン-P EG化の態様の最も重要でかつすぐに考えつく用途の1つは、創傷の治ゆを助け創傷部位の炎症を減少させるため創傷に対し応用するためのさま

ざまな包帯を伴う、クリーム又はゲルといったさまざま局所的製剤形態又はこ

のような製剤形態の組合せの中にこれらを内含させることにある。本発明のキメラタンパク質、P N-1変異体及びこれらのタンパク質のシスティン-PEG化の態様が、炎症を低減させる上で有効であると考えられていることから、本発明のキメラタンパク質、P N-1変異体及び／又はこれらのタンパク質のシスティン-PEG化の態様を含む注入製剤は、炎症を減少させるべく、炎症を起こしている関節又は体のその他の炎症部域の中に直接注入することができる。さらに、本発明の製剤は、炎症が起らないようにするために、外傷（例えば外科手術において）ひいては炎症を受ける可能性のある特定の部位に対して、キメラタンパク質、P N-1変異体及び／又はこれらのタンパク質のシスティン-PEG化の態様を供給することによって、予防的に使用することもできる。

一般に、本発明のキメラタンパク質、P N-1変異体及び／又はシスティン-PEG化タンパク質を含む薬学組成物は、約5～8、より好ましくは6～8のpHで、薬学的に受容できる無毒で不活性の水性拘束媒質の中で調剤されるが、この薬学組成物の好ましいpHは利用されるタンパク質及び治療すべき状態に応じて異なる。

本発明で特に有利なのは、システィン-PEG化タンパク質及びこれらのタンパク質を含む薬学組成物である。タンパク質のPEG化は、治療用に直ちに使用でき（すなわち再構築を必要としない）、未修正タンパク質に比べ増大した可溶性及び増大した半減期があるかつ免疫原性及び抗原性が低下したタンパク質を生成する(Nucci et al, 1991, Adv. Drug Delivery res. 6: 133-151)。PEG化されたタンパク質の半減期の増大は、有効用量として必要とされるタンパク質の量を減らし、必要な投与回数及び頻度を減らし、患者がタンパク質に露呈されるのを減少させ、かくしてアレルギー反応、毒性効果又はその他の副作用の可能性が低くなる。PEG化されたタンパク質がもつこれらの特徴は、タンパク質の免疫原性及び／又は毒性に関する望ましくない副作用に対する可能性が比較的低いタンパク質の長期使用を可能にしている。タンパク質のPEG化によって半減期の増大に影響が及ぼされるタンパク質の例としては、hGH、インシュリン、インターフェロン-アルファ2A (IFN-アルファー-2A、インターフェロン

—アルファ2B (IFN-アルファー2B)、tPA、EPO、G-CSF、抗原E、アルギナーゼ、アスパラギナーゼ、アデノシンデアミナーゼ、バトロクソビン、ウシ血清アルブミン、カタラーゼ、エラスターーゼ、 $\gamma$ -因子、ガラクトシダーゼ、アルファーガラクトシダーゼ、ベーターグルクロニダーゼ、IgG、ミツバチ毒、ヘモグロビン、インターロイキン-2、リバーゼ、フェニルアラニニアノニアリーゼ、アルファープロテイナーゼ阻害物質、プローウロキーゼ、ブリンヌクレオシドホスホリラーゼ、ブタクサアレルゲン、ストレプトキナーゼ、スーパーオキシドジスマターゼ、tPA、D-アルファートコフェロール、トリプシン、トリプトファンアーゼ、ウリカーゼ及びウロキナーゼがある（一般に、Nucci et al. 前掲書を参照のこと；また、Davis et al. 1981 Clin. Exp. Immunol. 46: 649-652(ウシアデノシンデアミナーゼ)；Nishimura et al. 1985 Life Sci. 33: 1467-1473(バトロクソビン)；Savoca et al. 1979 Biochimica et Biophysica ACTA 578: 47-53(アルギナーゼ)；Till et al. 1983 J. Trauma 23: 269-277(アスパラギナーゼ)；Veronesi et al. 1983 J. Pharm. Pharmacol. 35: 281-283(スーパーオキシドジスマターゼ)；Davis et al. 1981 Lancet 2: 281-283(尿酸オキシダーゼ)；及びDellinger et al. 1976 Cancer (ガン) 38: 1845-1846も参照のこと）。

PEG化タンパク質は、さまざまな疾病的治療のために投与することができる。疾患状態の症例及びこれらの疾病に治療において有用なタンパク質の例を、表6 Aに示す。

表6A

## タンパク質療法に導くことのできる疾病症例

<u>酵素の欠損</u>	<u>内毒素ショック/敗血症</u> 殺菌性/透過性増大蛋白質 脂質結合蛋白(KBP)
アデノシンデアミナーゼ プリンヌクレオチド ホスホリラーゼ ガラクトシダーゼ $\beta$ -グルクロニダーゼ	
ガン療法のための酸化防止剤 スーパーオキシドジスムターゼ カタラーゼ	<u>血液タンパク質の置換療法</u> ヘモグロビン アルブミン
<u>ガン</u> インターフェロン $\alpha$ インターフェロン $\gamma$ IL1- $\alpha$ フェニルアラニンアンモニアリアーゼ アルギナーゼ L-アスパラギナーゼ ウリカーゼ 顆粒球コロニー刺激因子(GCSF) モノクローナル抗体 組織壊死因子	<u>成長因子(創傷治癒、赤血球形成 の誘発などに使用)</u> 表皮細胞成長因子 G-CSF インターフェロン $\gamma$ 形質転換成長因子 EPO トロンボポエチン インシュリン様成長因子-1 インシュリン hGH

<b>心臓血管疫病</b> 組織プラスミノーゲンアクチベーター ストレプトキナーゼ (未変性又はキメラ) ウロキナーゼ (未変性又はキメラ) $\alpha$ -抗トリプシン 抗トロンビン-III その他のプロテアーゼ又は プロテアーゼ阻害剤 アボリポタンパク質(特にB-48) 循環スカベンジャー-レセプター APO A1:  ;重度の複合性免疫欠損症のため  ;低密度リポタンパク質を高密度タンパク質に変換する	
---	--

上述のとおり、キメラタンパク質、P N-1 変異体及びシステイン-P E G化タンパク質は、製剤の形で及び上述の投与経路によって送り出すことができる。特定の製剤形態、正確な用量及び投与経路は、担当の医師によって決定されることになり、又各々の特定の状況に従って変動する。このような決定は、治療すべき状態、投与すべきタンパク質、特定のタンパク質の薬物速度プロフィールといったような変数ならびに、患者の疾病状態(例えは重症度)、年令、体重、性別、食餌法、投与時間、薬物組合せ、反応感受性、療法に対する寛容性及び療法に対する応答性といったような、薬物としてのタンパク質の有効性を修正しうるさまざまな要因を考慮することによって行なわれる。長期にわたり作用するタンパク

質薬物は、3~4日に一回、一週間に一回、又は2週間に一回の割合でしか投与

できない。薬学組成物中でシスティン-PEG化タンパク質が使用される場合、例えば、システィン-タンパク質の上のPEG半分の数、PEG半分のサイズを変更することによって、患者の特定のニーズに合うよう究極的融通性を与えるべく、クリアランス速度（すなわちタンパク質の半減期）を変動させることができる。

システィン-PEG化タンパク質が利用される場合、日々の摂取法は一般に、天然、組換え型又はPEG化タンパク質についての用量の範囲内になくてはならない。正常な用量は、投与経路に応じて最高約1gの合計量で、0.1～100マイクログラムの間で変動することができる。特定のタンパク質についての特定の用量に関する指針は、未変性タンパク質及び／又は従来の方法によってPEG化タンパク質のいずれかの投与に関する文献の中で提供されている。例えばフィブリン凝塊形成の予防のための抗トロンビン3の投与についての指針は、米国特許第5, 292, 724号及び5, 182, 259号の中に見い出しができ；毒物中毒になった個体の治療におけるヒト成長ホルモン(hGH)の投与についての指針は米国特許第5, 140, 008号及び第4, 816, 439号の中に見い出しができ；局所的潰瘍の治療におけるhGHの投与のための指針は、米国特許第5, 006, 509号の中に見い出しができ；貧血症の治療のための(EPO)の投与及びEPOの肺投与についての指針は、米国特許第5, 354, 934号中に見い出され；汎血球減少症の治療のためのEPO、GM-CSF、G-CSF及びマルチ-CSFの投与についての指針は、米国特許第5, 198, 417号に見い出しができ；鉄の過負荷を治療するためのEPOの投与についての指針は米国特許第5, 013, 718号中に見られ；異常ヘモグロビン症の治療におけるEPOの投与についての指針は米国特許第4, 965, 251号に見い出しができ；糖尿病の治療のためのインシュリンの投与についての指針は、米国特許第4, 478, 822号の中に見い出しができ；新生物の治療のためのアスパラギナーゼの送出しについての指針は、米国特許第4, 478, 822号及び4, 474, 752号の中に見られ；腫瘍の治療におけるレーザー-アスパラギナーゼの投与についての指針は、米国特許第5, 290, 773

号の中に見られ：外傷部位の処置のためのクリオゲル包帯内のプロスタグラジンE 1、プロスタグラジンE 2、プロスタグラジンF 2アルファ、プロスタグラジンI 2、ペプシン、パンクレアチン、レニン、パミン、トリプシン、パンクレリバーゼ、キモハピイン、プロメライン、キモトリプシン、ストレプトキナーゼ、ウロキナーゼ、組織プラスミノーゲン活性化体、フィブリノリシン、デオキシリボヌクレアーゼ、スチライン、コラゲナーゼ、アスパラギナーゼ、又はヘパリンの投与についての指針は、米国特許第5, 260, 066号の中に見い出すことができ；リボソーム内でのスーパーオキシドジスムターゼ、グルコセレブロシダーゼ、アスパラギナーゼ、アデノシンデアミナーゼ、インターフェロン（アルファ、ベータ及びガンマ）、インターロイキン（1、2、3、4、5、6、7）、組織壞死因子（TNF-アルファ又はTNF-ベータ）及びコロニ-刺激因子（CSF、G-CSF、GM-CSF）の投与についての指針は米国特許第5, 225, 212号の中に見い出すことができ；新生物形成病巣の治療におけるアスパラギナーゼ又はインシュリンの投与についての指針は、米国特許第4, 978, 332号の中に見い出すことができ；腫瘍成長の低減におけるアスパラギナーゼの投与についての指針は米国特許第4, 863, 910号の中に見い出すことができ；移植体拒絶の防止における抗体の投与についての指針は米国特許第4, 657, 760号及び5, 654, 210号に見い出すことができ；T細胞突然変異誘発、細胞障害性T細胞の誘発、天然キラー細胞活性の増大、インターフェロン-ガンマの誘発、細胞性免疫の回復又は増強及び細胞媒介抗腫瘍活性の増大を含む免疫調節状況に対する療法としてのインターロイキン-1の投与についての指針は、米国特許第5, 206, 344号に見い出すことができ；腫瘍の治療におけるインターロイキン-2の投与についての指針は、米国特許第4, 690, 915号の中に見い出すことができ；さらに、ガン化学療法までの造血の刺激及び免疫障害の治療におけるインターロイキン-3の投与についての指針は、米国特許第5, 166, 322号の中に見い出すことができる。

上述の全ての米国特許は、その中で記述されている特定のタンパク質及び／又はPEG化タンパク質の投与において提供される指針に関して、本明細書に参考として内含されている。

いくつかのPEG化タンパク質は、米国食品医薬品局（FDA）によってすでに使用承認を受けている。これらのPEG化タンパク質としては、hGH、インシュリン、インターフェロンーアルファ2A、インターフェロンーアルファ2B、tPA、EPO、G-CSF、及びPEG化タンパク質を内含するB型肝炎ワクチンがある（Nucci et al.前掲書中）。

PEG化タンパク質は療法において有用なものであることから、PEG化のためのアミノ酸残基の正確な選択を可能にし、かくして未修正の親タンパク質の活性を保持するPEG化タンパク質の生成の可能性を増大させる、特異的部位でのPEG添加タンパク質の生成方法に対する明らかなニーズが存在する。

PN-1は血漿中に大量に発見されず、まず第一に組織内で機能しうる、ということが指摘される。PN-1の高親和性ヘミリン結合部位は、表面及び周囲の細胞外基質上に硫酸化されたプロテオグリカンを内含する結合組織及び細胞にPN-1を局在化させるのに役立つと思われる。かくして、PN-1の一次的役割は、血液ではなく組織内でのタンパク質分解活性を調節することにあると思われる。PN-1は脳組織中を周回することから、本発明のもう1つの態様には、末梢又は中枢神経の再生を容易にするためPN-1変異体又はキメラタンパク質を含む本発明の製剤を送り出すことが関与している。炎症及び創傷の治療におけるPN-1の使用のための製剤形態、投与経路及び用量については、米国特許第5,206,017号、5,196,196号；及び5,112,608号の中で記述されており、その各々は、PN-1を用いたこのような治療方法が記述されているかぎりにおいて、参考として本書中に内含されている。

一般に、経口送り出し系統によりキメラタンパク質又はプロテーゼネキシン-1及びその変異体といった大きいタンパク質化合物を投与することによって望ましい結果を得ることは不可能である。このようなタンパク質は、一般にGI路内で消化され（特別な抗体を伴って処方されているのでないかぎり）、このような消化のためそのもの形状で心臓血管系の中に入ることはない。キメラタンパク質、PN-1変異体、及び／又はこれらのタンパク質のシステイン-PEG化の態様は、筋内又は静脈内といったあらゆるタイプの注射によって投与でき、かくしてGI路を回避できる。その他の投与様式としては、嚥葉及び／又は局所用

クリーム組成物によって提供される経皮投与及び経粘膜投与が含まれる。経粘膜投与には、鼻粘膜と接触しこれらの膜を通して直接心臓血管系の中へ拡散する経鼻製剤の中にキメラタンパク質、プロテアーゼネキシン-1変異体及び／又はシステイン-PEG化タンパク質を含む鼻内噴霧製剤形態が含まれる。PEG化タンパク質は、膜を横断する高い能力を有する可能性があり、かくして体内により容易に進入できる。肺内送り出し用のエアゾル内にキメラタンパク質、PN-1変異体を含む製剤形態も、点眼薬の形での送り出しのための眼科用製剤の中にキメラタンパク質又はPN-1変異体が含まれている眼内送り出し系と同様に、本発明において考慮されている。

以上に提案されている投与方法のいずれも、さまざまな異なる製剤形態で提供することができる。製剤形態は、キメラタンパク質又はPN-1変異体を全身的に又は特定の部位に対して提供するように設計することができる。さらに、製剤形態は、できるかぎり早急に又は持続放出又は限時放出の形でキメラタンパク質又はPN-1変異体を提供するように設計できる。例えば、創傷の治ゆ及び炎症の防止を連続的に補助する目的で創傷部位にキメラタンパク質又はPN-1変異体をゆっくりと放出することのできる局所的重合体製剤全体に本発明のキメラタンパク質又はPN-1変異体を含有させるか又は分配させた局所的製剤形態を作り出すことができた。

上述の通り、心臓血管系の中にキメラタンパク質、PN-1変異体及び／又はシステイン-PEG化タンパク質を導入するために、さまざまな異なる仕方で本発明の異なる製剤形態を投与することができる。キメラタンパク質、PN-1変異体及び／又はシステイン-PEG化タンパク質は、一般に例えば、タンパク質分解活性の遮断；腫瘍の成長又は転移の阻害；創傷の治ゆ及び／又は神経纖維再生の促進；タンパク質欠損状態（例えば糖尿病）のための代償療法；細菌、真菌又はウイルスの成長阻害；免疫応答の増強；骨髄基幹細胞の成熟の誘発（例えば骨髄移植における）；血液凝固の調節；炎症の治療；又は細菌性敗血症及び内毒素性ショックの治療；アルブミン又はヘモグロビンの置換（例えば輸血を置換するため）に関するさまざまな目的のために投与される。特に、キメラタンパク質、PN-1変異体及び／又はこれらのタンパク質のシステイン-PEG化の態様

を

含む: 静脈内製剤形態は、その血栓崩壊防止効果で有用なものであり、従って、発作及び／又は心臓発作時の補助及び防止及び／又は軽減のために投与することができる。

#### 実施例

以下の例は、本発明の P N-1 変異体をいかに製造し使用するかについての完全な開示及び説明を當業者に与えるべく提供されるものであり、発明者が自らの発明とみなしているものの範囲を制限することを意図したものではない。会合速度定数及び温度といった与えられた明細に関する精度を確保するための努力が払われてきたが、幾つかの実験上の誤差及び偏差を考慮すべきである。製剤形態例に関しては、部は重量部であり、温度読み取り値はすべて摂氏温度単位であり、全ての実験は大気圧又はその前後で行なわれた。

#### 実施例 A

##### P N-1 の合成

P N-1 は、本明細書に参考として内含されている Scott, R.W et al., J. Biol. Chem. (1985) 260; 7029-7034 により詳細に記述されているとおりヘパリンアガロース上でのアフィニティクロマトグラフィとそれに続くゲル排除クロマトグラフィにより、微粒子担体培養内でヒト包皮線維芽細胞によって調整された無血清培地から、均質性が得られるまで精製された。当然のことながら、親和力結合のためヘパリンを含んでいるその他のクロマトグラフィ支持体又は c m セファロース又は S -セファロースといったその他の基質も同様に使用可能である。精製されたタンパク質は、沈降平衡分析法に基づく 4.2 ~ 4.3 kd の M T を示すか、又はゲル排除クロマトグラフィから見積られた 4.7 kd の M T を示す。精製された材料は、トロンビン、ウロキナーゼ及びプラスミンを伴うドデシル硫酸ナトリウム安定の複合体の形成；プロテアーゼ活性の阻害、トロンビンのヘパリン増強された阻害；及びヘパリン感受性反応におけるプロテアーゼ-P N 複合体の細胞結合を含む、調整培地中に内含された時点での P N-1 が示す特性を示している。分離され精製されたプロテアーゼネキシンの N 末端アミノ酸配列は、最初の 34 の

アミノ酸について以下のものであることが決定された：

**first 34 amino acids to be: Ser-His-Phe-Asn-Pro-Leu-Ser-Leu-Glu-Glu-Leu-Gly-Ser-Asn-Thr-Gly-Ile-Gln-Val-Phe-Asn-Gln-Ile-Val-Lys-Ser-Arg-Pro-His-Asp-Asn-Ile-Val-Ile.**

本発明のP N - I 変異体は、上述の仕方で分離され、そして精製された純粋な P N - I を利用することによって合成することができる。この変異体は、P I 及び P I' 部位で精製された P N - I タンパク質を分割し、この部位にあるアルギニン、セリン又は両方の残基を望ましい非極性置換残基と置換することによって得ることができる。望ましい残基を望ましい非極性残基と置換した後、当業者にとっては既知のプロトコルを利用してセグメントを融合させることができる。かかる方法は、本発明の変異体を得る目的に利用できたものの、幾つかわざらわしいものであり、しかも、抽出し精製できる P N - I の量が非常に少ないとから極めて制限されている。従って、上述の手順を利用することはできたが、これが本明細書中で開示されている P N - I 又は変異体を製造する好ましい方法というわけではない。P N - I 及びその変異体は一般には、以下で記述するとおり、組換え型技術を利用して產生される。

#### 実施例 B

##### P N - I の一般化された組換え型合成

組換え型技術を利用してプロテアーゼネキシン- I を產生する方法が、プロテアーゼネキシン- I を產生する上で利用される組換え型技術を開示すべく本書に参考として内含されている欧州公開特許出願873049126号の中で開示されている。手順は、P N - I 変異体を得るべくこの開示を読んだ当業者によって修正され得る。

完全ヒト P N - I タンパク質をコードする c D N A を、包皮線維芽細胞D N A ライブリから得た。このクローンの検索には、未変性タンパク質の中で決定されたアミノ酸配列に基づいたプローブが利用された。クローニングされた c D N A は、担体ベクターからコーディング配列を切除しそれを適切な発現システム内へ連結させることによって、原核生物及び真核生物の両方の組換え型細胞の中で

の発現に導くことができる。

P N-1は(発現系の選択に応じて、処理できるか又はできないものである)M e t N末端アミノ酸が先行する成熟タンパク質として直接產生させることもできるし、又は望ましい付加的なあらゆるN末端又はC末端配列に対する融合タンパク質として產生させることもできるし、あるいは、独自の配列又は例えば細菌ラクタマーゼ遺伝子又はインシュリン又は成長ホルモンといった分泌されたヒト遺伝子と結びつけられた既知のシグナル配列などによって提供される非相同配列である1つのシグナル配列が先行する場合には成熟タンパク質として分泌させることもできる。部位特異的突然変異誘発により望ましいコーディング配列に関して適当な場所で適切な制限部位を提供するための手段は充分に理解されており、従ってコーディング配列には、シグナル配列又は融合配列への付着又は発現ベクター内への付着のための適切な部位を備えることができる。

細菌宿主が選択された場合、タンパク質がグリコシル化されていない形で產生されることになる可能性が高い。P N-1が「成熟」タンパク質として細胞内で產生されるならば、N末端メチオニンは部分的にのみ処理されるか又は全く処理されない可能性がある。したがって、產生されたタンパク質は、N末端M e tを含む可能性がある。細胞内又はかかる細菌宿主から分泌されたものとして產生されたタンパク質の修正は、ジスルフィド結合を切断し再形成するための技術又はその他の翻訳後のex vivo処理技術を使用して再生することによって多糖物質を提供することにより行なうことができる。タンパク質が哺乳動物又はその他の真核生物宿主の中で產生される場合、細胞環境は、翻訳後の処理がin vivoで起こりうるようなものであり、グリコシル化された形態のタンパク質が產生される可能性が最も高い。

組換え型細胞は、問題の宿主にとって適当な条件下で培養され、タンパク質は、発現様式によって決定される通り、細胞リゼイクトからか又は培地から回収される。タンパク質の精製は、Scott, R.W. et al., J. Biol Chem (前出)によつて開示されているものと類似する方法を用いてか又は当該技術分野において既知のその他の手段によって達成できる。

P N - 1 の產生についてコードするDNAセグメントがひとたび細菌宿主の中に挿入されたならば、当然そのセグメントの数多くのコピーを、その細菌を成長

させることによってクローニングすることができる。セグメントは、分断された細胞を遠心分離に付すことによってDNAを抽出し、次に抽出されたDNAを酵素消化に付しその結果としてゲル電気泳動及びプロッティングといった分離プロセスに消化済みDNAを付すことによって望ましいセグメントを得るようにする従来の方法を利用することによって、細菌から抽出することができる。その後、アルギニン及び／又はセリンについてコードするコドンを望ましい非極性アミノ酸残基の產生についてコードする新しいコドンで置換するため、P N - 1 の產生についてコードするセグメントを従来の組換え型方法に付すことができる。このような組換え型セグメントがひとたび產生されたならば、望ましいP N - 1 変異体の產生を得るために上述の要領でベクター及び宿主内へこれらを再度挿入することができる。当事者にとって既知のものであるさまざまなベクター及び宿主系を使用することができる。

さらに、組換えにより產生されたP N - 1 を用い、次に、望ましい「R」基（例えばセリン346の-OH）だけを非極性「R」基（例えば-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-s-CH<sub>3</sub>）で置換してP N - M e t<sub>346</sub> 変異体を得ることによってP N - 1 変異体を作ることができるということが指摘される。このような「R」基の置換は、当事者にとって既知のものである公開されたプロトコルを用いて実施できる。

#### 実施例C

##### バキュロウイルス発現系を用いた昆虫細胞内での組換え型P N - 1 変異体の产生

###### c. 1. プラスミド発現ベクターの構築

昆虫細胞の体内でP N - 1 及び／又はP N - 1 変異体を产生するためには、c DNA配列をまずp A C 3 7 3といった適当なプラスミド発現ベクター内に挿入しなければならない。この挿入のための適切な制限部位は、標準的部位特異的突然変異誘発手順によって作り出すことができる。適当な発現ベクターに必須の特性としては、p A C 3 7 3のポリヘドロン遺伝子プロモータといった転写プロモータ及びバキュロウイルスゲノムへの組換えを導くためのフランкиング相同配列

が含まれる。このプラスミドベクター内に存在するポリヘドロン遺伝子からのもとのといったポリアデニル化シグナルが組換え型遺伝子の発現にとって必要である場合もあればそうでない場合もある。転写プロモータそして場合によってはポリ

アデニル化シグナルを含む調節配列に並置された、*E. coli* の $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子といった標識遺伝子がベクター内に含まれていることもあるが、対流した遺伝子の発現にとって必須のことではない。

#### c. 2. 組換え型バキュロウイルスの作製

P N-1 標的遺伝子を含む発現プラスミドと野生型バキュロウイルスDNAの間の相同組換えによって、キメラバキュロウイルスが作り出される。プラスミド及び野生型バキュロウイルスDNAを、リン酸カルシウム技術により同時沈降させ、感染を受けていない*Spodoptera frugiperda*(S f 9)昆虫細胞に付加する。トランスフェクションから4~7日後に、細胞は、細胞変性形態を示し、ウイルス感染によって標準的に產生される核閉塞体を内含することになる。野生型及び組換え型の両方のウイルスを含む細胞無しの培地を収穫する。

#### c. 3. キメラバキュロウイルスの同定及び分離

ウイルスのクローナル分離株は、アガロースが重ねて置かれた S f 9 細胞単層上でのブラーク精製により、この同時トランスフェクション株から得ることができる。分析のためのブラーク候補は、閉塞体について陰性であるブラーク形態によって同定されることになる。発現プラスミドが $\beta$ -ガラクトシダーゼといった標識遺伝子を含んでいる場合には、組換え型ブラークは、アガロース平板培養培地内の5-ブロモ-4-クロリル-3-インドリル-b-D-ガラクトピラノシド(X-gal)といった色素產生基質から生成された青色によって表示されることになる。マルチウェル皿の中での細胞の接種のために、採取したブラークを使用する。標準的な活性又は免疫検定を用いて、組換え型P N-1 の発現について、結果として得られた細胞リゼット及び感染した細胞の上清を評価することができる。陽性のウェルには、野生型の汚染のない純粋な組換え型ウイルス株を得るために、さらなるブラーク精製の回数が必要とされる可能性がある。

#### c. 4. P N-1 のバッチ产生

S f 9 細胞は、ExCell1 (J. R. Scientific) といった無血清の低タンパク質培地内で成長に対し適合させられる。穏やかに遠心分離することによって細胞を懸濁培養から收集し、細胞 1 個あたり 1 つのウイルスplaque形成単位の多数の感染を用いて、1mlにつき 1,000 万個の細胞の濃度でウイルス接種物を含む新鮮

培地の中で再懸濁させる。2 時間後、培養を新鮮培地で 5 倍に希釈し、2~3 日間インキュベートさせる。この時間の経過後、遠心分離により細胞をペレット化し、調整培地を収穫する。P N-1 を、標準的な手段によって、細胞を含まない上清から精製する。

P N-1 の変異体は、上述のものと同じ方法で作製し產生させることができる

\*

#### c. 5. 昆虫細胞由来の P N-1 の特徴づけ

バキュロウイルス発現系を用いて昆虫細胞内で產生される P N-1 は、およそ 42,000 Kd の分子量をもつグリコシル化されたタンパク質である。N 末端アミノ酸配列は、成熟した哺乳動物の細胞の P N-1 のものと同一であり、このことはシングナル配列の適正な処理を表わしている。ヘパリンの速度増強効果を含めた、比活性とトロンビン及び会合速度論の関係は、真正 P N-1 からは識別できない。

#### 実施例 D

封入体又は可溶性形態中での大腸菌における組換え体 P N-1 変異体の產生

##### D. 1. P N-1 のクローニング

P N-1 のクローニング及び発現が記載されている (McGrogan, et al., (1988) Bio/Technology)。それぞれ NdeI 及び BclI 部位を生じる以下のオリゴヌクレオチド：

P N P C R - 前進 5' TG.GAA.GGA.CAT.ATG. AAC.TGG.CAT.CTC

P N P C R - 復帰 5' TCT.TTT.GTA.TAC.TGA.TCA. GGG.TTT.GT

を用いて CHO 発現ベクターから PCR により、P N-1 に対する遺伝子を生成した。その結果生じた断片を NdeI 及び BclI で切断して、p GEMEX-1 ベクター (Promega) 中にサブクローニングした。

p G E M E X 大腸菌発現ベクターは 3 つの RNA ポリメラーゼプロモーターを含有する。T 7 プロモーターを遺伝子 10 リーダー断片から上流に位置させた。

我々は p G E M E X から遺伝子 10 領域を除去したが、T 7 - RNA ポリメラーゼ結合部位並びに Nde I 及び BamH I クローニング部位を保持した。これを作成するために、部分 Nde I 消化とその後のケレノウ充填及び再結合により、p G E M E X 中の 3251 の Nde I 部位を除去した。このプラスミドは p

T 7 - NK と呼ばれる。p T 7 - NK を Nde I 及び BamH I で切断して、遺伝子 10 融合タンパク質領域を除去した。線状ベクターを単離し、PCR 生成 PN-1 線状断片と結合し、上記のように Nde I 及び Bcl I で切断した。このプラスミドは p T 7 PN-1 と呼ばれる。PN-1 に関する全コード領域をシーケンシングすることにより、正確な配列を確証した。

PCR 及びそれ自身 Nde I 及び Sal I 部位を有する以下のオリゴ体：

PCR M E T 前進 5' GAT.ATA.CAT.ATG.TCC.CAC.TTC.AAT.OCT.CTG

PCR M E T 復帰 5' GGG.GGC.ACT.TGT.CGA.CCC.ACA.CCG.GAA

を用いて原シグナル配列を除去した。これは、原信号に取って代わり得る 690 塩基対断片、並びに開始コドン (Met) を有する PN-1 のアミノ末端の一部及び PN-1 のアミノ末端を生成した。再びシーケンシングにより正確な配列を確認した。その結果生じるタンパク質の発現は、封入体中で又は可溶性タンパク質として細胞内で生じると予測される。

#### D. 2. PN-1 の突然変異誘発

プラスミド p T 7 PN-1 は、一本鎖 DNA の產生のための f1 ori を有する。したがって、Kunkel の方法 (Kunkel, T.A. (1988) : Nucleic Acids and Molecular Biology (Eckstein, F., Lilley, D.M.J. Eds.) Vol.2, p.124, Springer-Verlag, Berlin and Heidelberg) による部位指向性突然変異誘発のための創型として用いられる ssDNA の产生のために、p T 7 PN-1 を大腸菌 C J 236 株中で形質転換した。

突然変異体生成のための一般的論述は、4 つの一般的方法に基づいている。

第一の方法では、P 4 ~ P 4' 領域における單一アミノ酸置換は、部位指向性

突然変異誘発により生成される。概して、P1部位での置換は最も劇的な効果を有する。しかし、活性部位領域内の他の残基での置換は、セリンプロテアーゼによる速度定数に関連して変化を示す。

第二の方法では、他のセルビンの活性部位領域に見いだされる配列をPN-1上にグラフトした。活性部位でどの位多くの配列を変化させて特異性及び反応速度を変化させねばならないかを調べるためにには、多数の組合せを作らねばならない。P4～P4'領域は最も重要であることが一般に判明しているが、しかしこ

の領域外のアミノ酸残基はプロテアーゼ阻害に顕著な作用を及ぼし得た。

第三の方法では、特に良好な基質であることが分かっている配列を加えるか又は用いてPN-1の配列を置換する。これらの突然変異体を作る前には、これらの変化がPN-1の阻害作用を害し、タンパク質分解の阻害剤から基質中にPN-1を引き離すか否かは明らかではなかった。事実、サブチリシンに対する良好な基質配列であるAla-Ala-Pro-PheのPN-1への取り込みは、サブチリシンにより特によく切断される分子を生じる。しかし、このアプローチに基づいた哺乳類セリンプロテアーゼの良好な阻害剤であるPN-1変異体がここに得られた。

第四の方法では、ファージ表示系を用いて最適阻害剤配列を生成し得る。PN-1は標的のプロテアーゼと共有的相互作用を形成するため、親PN-1分子より緊密に結合する突然変異体を選択していないことが重要である。むしろ、ファージ表示性変異体PN-1ライブライマーを短時間だけ固定標的のプロテアーゼと相互作用させてより迅速に標的のプロテアーゼと結合するPN-1変異体を選択する。したがって、迅速結合変異体のみが選択される。これはファージ表示系の新規の用途である。

以下のオリゴヌクレオチドを用いて、配列の最後に示したプロテアーゼに特異的な突然変異体を生成した：

5'GCA.ATT.CTC.ATT.GCA.NN(G/C).TCA.TCG.CCT.CCC [R345I,  
R345M, R345L, R345V] (エラスター $\gamma$ ), R345K (プラスミン), R345D,  
R345E 5'ATT.CTC.ATT.GCA.GTG.AGC.TCG.CCT.CCC.TG R345V  
(エラスター $\gamma$ )

5'ATT.CTC.ATT.GCA.AGA.ATA.TCG.CCT.CCC.TGG S346I  
(X a 因子)  
5'ATT.CTC.ATT.GCA.AGA.ACA.TCG.CCT.CCC.TCC S346T  
(X a 因子、C 1 -エステラーゼ),  
5'ACA.ACT.GCA.ATT.CTG.GCT.GGA.AGA.TCA.TTG.AAT.CCC.TGG.  
TTT.ATA I343A;A344G;S347L;P348N (ATIII様、トロンビン、X a 因子)

5'ACA.ACT.GCA.ATT.CTC.TTT.CCA.AGA.TCA.TCG.CCT.CCC  
I343F;A344P (FPR、トロンビン)  
5'ACT.GCA.ATT.CTC.ATT.CCA.TTA.TCA.TCG.CAG.GTC.CGG.TTT.  
ATA.GTA.GAC A344P;R345L;P346Q;P349V;W350R (HCII様)

5'GAA.GAT.GGA.ACC.AAA.GCT.TCA.GAC.TTT.TTG.GCT.GAA.GGT.  
GGC.GGT.GTA.AGA.TCA.TCG.CCT.CCC.TGG A336D;A337F;  
T338L;T339A;A340E;I341G;L342G;A344V (フィブリノーゲン様、  
トロンビン)  
5'GCA.ACA.ACT.GCA.ATT.ATC.GAG.GGA.AGA.TCA.TCG.CCT  
L342I;I343E;A344G (X a 因子)  
5'ACA.ACT.GCA.ATT.CTC.GAG.CCA.GTA.TCA.TCG.CCT.CCC  
I343E;A344P;R345V (エラスター $\gamma$ 、カテーテル G)  
5'ACT.GCA.ATT.CTC.ATT.GGA.AGA.TCA.TCG.CCT A344G (高反応速度)

5'ACT.GCA.ATT.CTC.ATT.CCA.AGA.TCA.TCG.CCT A344P (高反応速度)

5'GCA.ACA.ACT.GCA.ATT.AGC.CCT.TTC.AGA.TCA.GTG.CAG.CCC  
TGG.TTT.ATA L342S;I343P;A344F;S347V;P348Q  
(高分子キニノーゲン様； カリクレイン)

5'GCA.ACA.ACT.GCA.ATT.GCC.GCT.CCA.TTC.TCA.TTG.CCT.CCC.  
TGG.TTT L342A;I343A;A344P;R345F (カテーテル G)  
5'GCA.ACA.ACT.GCA.ATT.GCC.GCT.CCA.GTA.TCA.TCG.CCT.CCC.  
TGG.TTT L342A;I343A;A344P;R345L (エラスター $\gamma$ )

5'GCA.ACA.ACT.GCA.ATT.GCC.GCT.CCA.CTA.TCA.TCG.CCT.CCC.  
TGG.TTT L342A;I343A;A344P;R345L (エラスター $\gamma$ )  
5'GCA.ACA.ACT.GCA.ATT.GCC.GCT.CCA.ATA.TCA.TCG.CCT.CCC.

## TGG.TTT L342A;I343A;A344P;R345I (エラスターーゼ)

## D. 3. 大腸菌におけるプロテアーゼN c x i n変異体の発現及び精製

J M 1 0 9 (D E 3) は、誘導 lac プロモーターの制御下で T 7 RNA ポリメラーゼをコードする遺伝子の染色体のコピーを含有する。p T 7 P N - 1 (又は P N - 1 の変異体) を含有する J M 1 0 9 (D E 3) を 2 x Y T + 0. 2 % ダルコース + 1 0 0 mg/ml カルベニシリン中で 2 8 ~ 3 2 °C で一夜増殖させた。低温及び高栄養含有溶液は、増殖性接種体を生成するのに役立つ。接種物を 1 : 2 5 0 0 に希釈して、振盪フラスコ中で O D 600-1 に、又は 2 6 ~ 3 7 °C で発酵器中で - 5 0 に増殖させ、0. 1 ~ 1. 0 mM で 4 ~ 1 6 時間、I P T G で誘導した。遠心分離により細菌を収集し、1 0 mM TRI S, pH 8, 1 mM EDTA 中に再懸濁して、高压均質化により壊碎した。遠心分離により封入体を収集し、1 M NaCl, 0. 0 5 % トリエチルアミンで洗浄し、迅速希釈により 6 M グアニジン溶液からタンパク質を再生した。P N - 1 は、Fast S セファロース上で捕獲して精製し、0. 6 M NaCl で溶離して、0. 2 5 M NaCl に希釈し、Fast Q セファロース上を通して、内毒素を除去し、Fast S セファロース上で再捕獲して 0. 6 M NaCl 又は 0. 2 5 ~ 1 M NaCl 勾配で溶離した。

あるいは、P N - 1 は、発酵条件を調整することにより大腸菌内で可溶性形態で生成し得る。この操作により、封入体物質の付随的損失に伴って発酵温度が 3 7 °C から 2 6 °C に低下した場合、可溶性 P N - 1 の収量が増大する。これは、原 P N - 1 を大腸菌に附加した場合 P N - 1 は殺菌性であるため、全く予期せぬ知見である。可溶性 P N - 1 を精製するために、遠心分離及び通過により、あるいはポリエチレンイミン又は Biacryl TM のようなポリカチオンで処理したのちに遠心分離及び濾過することにより、壊碎工程からの細胞上清を清澄化して、可溶性タンパク質を上記のように精製した。可溶性物質の生成には多数の利点がある：即ちタンパク質が正確に折り畳まれることがより確実で、再生工程がなく、バッ

チからバッチへの再現性がより大きいことである。

P N-1 の生産量は、細胞ペースト 1 g 当たり約 50 mg であった。これは、1 O D 600 の細胞密度での生産量約 50 mg/l 又は発酵物 1 リットル当たり可溶性 P N-1 が 2.5 g に相当する。これは、P N-1 生産の技術状態において実質的増進を示す。

#### D. 4. P N-1 変異体に関する活性検定

標準検定においてトロンビンを阻害する能力に関して再生又は可溶性タンパク質を調べた。要するに、P N-1 変異体の連続 2 倍希釈液を微小滴定プレートウェルに付加 (50 μl/ウェル) し、その後 30 μg/ml へパリン溶液 50 μl、次いで 50 μl に 1 NIH 単位のトロンビンを加えた。これらを 25°C で 15 分間インキュベートした。0.625 mg/ml の S-2238 (Kabi Pharmaceutical s) を 50 μl 加えて残留トロンビン活性を測定した。基質 S-2444 を用いてウロキナーゼを、基質 S-2390 を用いてプラスミンを、基質 S-2288 を用いて tPA を、基質 S-2222 又は S-2765 を用いて Xa 因子を、基質 S-2302 を用いてカリクレインを、s-APPV-pna (Sigma) を用いてカテプシン G を阻害する能力に関して、同様の方法で、ヘパリンを加えて又は加えずに、P N-1 変異体を試験した。

等モル量の各タンパク質（上記のように滴定により確定）を組合せることにより適切な阻害剤-プロテアーゼ組合せに関して、1 秒から 4 時間までの種々の時間（適宜）、二次速度会合定数を確定し、活性損失を追跡調査した。その結果生じた曲線から  $t_{1/2}$  を概算した。等式  $\ln 2 / (P N-1) \times t_{1/2}$  に従って  $k_{assoc}$  を概算した。あるいは、対数（標準化活性）対時間のプロットの勾配から見かけの一次速度定数を確定した。見かけの一次速度定数を使用した P N-1 (又は変異体) 濃度で割って、二次速度定数を算出した。

#### 実施例 E

##### A T F - P N 1 キメラの生成

このキメラを生成するために、我々は先ず、それぞれ NdeI 及び MluI 部位を生成するオリゴヌクレオチド：

A T F. 前進 5' GGT.GAT.CAT.ATG.AGC.AAT.GAA.CTT.CAT.CAA

A T F. 復帰 5' TTT.AGG.ACG.CGT.CTG.CCC.CAT.CTG.CTC.AGT.CAT.G

を用いてPCRによりuPAのアミノ末端断片をクローニングした。その結果生じた断片をNdeI及びMluIで切断し、同一酵素で切断したpT7PN1中にサブクローニングして、シグナル配列を移動した。このプラスミドをpT7APF-PN1と呼ぶ。T7染料プライマー系(ABI)を用いて自動シーケンシングにより、正確な配列を立証した。

ウロキナーゼ受容体結合領域を保持する多少短めのATF-PN1を生成するために、以下のオリゴヌクレオチド：

5'CAC.TGT.GAA.ATA.GAT.AAC.GCG.TAA.ACC.TGC.TAT.GAG.

を用いてコドン48での部位指向の突然変異誘発によりMluI部位(下線)を導入して、ATF48-PN1を作った。その結果生じたプラスミドをMluIで切断して300bpセグメントを除去し、結紮した。

#### ATF-PN1の突然変異誘発

プラスミドpT7ATF-PN1は、一本鎖DNAの産生のためのf1 or iを有する。したがって、Kunkelの方法(Kunkel, T.A.(1988): Nucleic Acids and Molecular Biology(Eckstein, F., Lilley, D.M.J. Eds.)Vol.2, p.124, Springer-Verlag, Berlin and Heidelberg)による部位指向の突然変異誘発のための鉄型として用いられるssDNAの産生のために、pT7ATF-PN1を大腸菌CJ236株中で形質転換した。さらに、標準分子生物学技法を用いて、pT7ATF-PN1中に当該PN1変異体をサブクローニングし得る。

#### ATF-PN1の発現及び精製

その結果生じたプラスミドを大腸菌JM109(DE3)株中で形質転換し、振盪フラスコ中でOD600-1に、又は発酵器中で-50に増殖させ、0.1~1.0mMで26~37℃で4~16時間、IPTGで誘導した。遠心分離により細菌を収集し、1.0mMTRIS, pH8, 1mMEDTA中に再懸濁して、高圧均質化により壊碎した。遠心分離により封入体を収集し、1MNaCl、0.05%TEAで洗浄し、6Mグアニジン溶液からタンパク質を再生した。FastSセファロース上で捕獲して精製し、0.6MNaClで溶離して、0.25MNa

C<sub>1</sub>に希釈し、Fast Qセファロース上を通して、内毒素を除去し、Fast Sセファロース上で再捕獲して0.6M NaCl又は0.25~1M NaCl勾配で溶離した。あるいは、遠心分離及び滤過により壊碎工程からの細胞上清を清澄化して、可溶性タンパク質を上記のように精製した。

#### ATP-PN1に関する活性検定

標準検定においてトロンビンを阻害する能力に関して再生又は可溶性タンパク質を調べた。要するに、ATP-PN1の連続2倍希釈液を微小滴定プレートウェルに付加(50μl/ウェル)し、その後30μg/mlヘパリン溶液50μl、次いで50μl中NIH単位のトロンビンを加えた。これらを25℃で15分間インキュベートした。0.625ng/mlのS-2238(Kabi Pharmaceutical s)を50μl加えて残留トロンビン活性を測定した。基質S-2444を用いてウロキナーゼを、又は基質S-2390を用いてプラスミンを用いてカテーテルを阻害する能力に関して、同様の方法で、ヘパリンを加えずに、ATF-PN1を試験した。

ELISAにより測定した場合の可溶性形態のウロキナーゼ受容体と結合する能力、又はウロキナーゼと可溶性ウロキナーゼ受容体との結合を阻害する能力に関して、再生又は可溶性タンパク質を試験した。さらにuPA受容体を発現するHT1080、U937又はTHP-1のような細胞と結合するuPA又はDFP/PMS処理uPAを阻害する能力に関して、ATF-PN1を調べた。

#### 実施例F

##### システイン-PEG化タンパク質の生成

###### F.1 マレイミド-PEG試薬の調製

以下の：

- 1) メトキシポリエチレンアミン(20μmol)(分子量5,000)100mg
  - 2) 20μmolγ-マレイミド酸-N-ヒドロキシスルホニミドエステル(GMBS)
  - 3) 100mlCaps緩衝液、pH10.0 2ml
- を混合することにより、マレイミド-PEGを調製した。上記の成分(特に1)及び2)の量及び指示容量は、変化し得る。例えば、メトキシポリエチレンア

ミン対G M B Sの比の差が10~100倍まで変わることは差し支えない。普通は、G M B Sに対して約2倍余分の上記1)が好ましい。種々の緩衝液をC a P sの代わりに用い得るが、T r i s緩衝液は反応を抑制するので、この混合物中にはT r i s緩衝液は用いないことが重要である。使用する緩衝液のpHはかなり変化し得るが、pH 8.0の緩衝液よりpH 10.0の緩衝液のほうが好ましい。さらに、上記の混合物は補助溶剤としてD M S Oを50%まで含有してもよい。反応混合物がジチオトレイトール(D T T)又はβ-メルカプトエタノール(β M E)のような還元剤を含有しないことが特に重要である。

混合物を37°Cで30分間インキュベートしたが、反応温度は4°Cと低くてもよく、反応時間は1時間まで又はそれ以上延長し得る。インキュベーション後、12mgのT r i s遊離塩基又はエタノールアミンを混合物に加えて、NH3部分を抑制した。この抑制工程は省いてもよい。

2.0mM T r i s(pH 7.4)、1.00mM N a C l及び0.1% T w e e nで平衡化させたP D-1カラム(G-25)(BioRad)を通す溶離により、反応混合物を精製する。溶離液を0.5ml分画中に収集し、50% T C Aで沈殿させることによりマレイミド-P E G試薬の產生に関して検定した。次に、その結果生じたマレイミド-P E G(M a l - P E G)試薬を用いて、P E Gをシステイン残基(单数又は複数)に付着させることにより選定タンパク質を修飾する。

#### F. 2 マレイミド-P E Gとタンパク質との反応

タンパク質をマレイミドP E G試薬と反応させる前に、精製タンパク質を、D T T又はβ M Eを含有しない任意の適切な緩衝液中に約200μg/ml~1mg/mlの濃度に希釈した。通常、緩衝液は2.0mM P I P E S、pH 6.75、0.6M N a C l及び1%グリセロールで構成された。約10μl~40μlの希釈タンパク質をP E G化反応に用いた。2.0mM T r i s(pH 7.4)、0.1M N a C l及び0.01% T w e e nから成る緩衝液10μl中に約1μlのマレイミド-P E Gを含有する溶液10μlずつを移入することにより、F. 1項に記載のマレイミド-P E G試薬を連続2倍希釈液中に希釈した。マレイミド-P E G対タンパク質の比は、所望のタンパク質の好ましいレベルのP E G化によって変化し得る。タンパク質に対して20倍まで過剰量のマレイミド-P E Gが試薬とタ

ンパク質のシスティン残基との特異的反応を提供した。

タンパク質及びマレイミド-P E Gを室温で1時間インキュベートしたが、この反応は4°Cより長い時間で実施してもよい。反応した混合物の試料を、SDS-PAGEにより分析して、完全カップリングに必要な最小量のマレイミド-P E G試薬を確定し得る。

上記の反応を用いて、マレイミド-P E G対タンパク質の適正比を確定し、次いで商業的に許容可能な量のP E G化タンパク質を产生するまで評価決定し得る。

#### F. 3 (マレイミド)z-P E G試薬の調製

以下の：

1) ポリエチレンビス(アミン)

2) 20 μmol γ-マレイミド酷酸-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(GMBS)

3) 100mM C a p s 緩衝液, pH 0. 0 2ml

を混合することにより、(マレイミド)z-P E Gを調製した。上記の成分(特に1)及び2))の量及び指示容量は、変化し得る。例えば、1)対2)の比の差が10~100倍まで変わることは差し支えないが、上記1)に対して過剰のGMBSが好ましく、通常は約2倍過剰である。種々の緩衝液をC a P s の代わりに用い得るが、T r i s 緩衝液は反応を抑制するので、この混合物中にはT r i s 緩衝液は用いないことが重要である。使用する緩衝液のpHはかなり変化し得るが、pH 8. 0の緩衝液よりpH 10. 0の緩衝液のほうが好ましい。さらに、上記の混合物は補助溶剤としてD M S Oを50%まで含有してもよい。反応混合物がジオトレイトル(D T T)又はβ-メルカプトエタノール(β M E)のような還元剤を含有しないことが特に重要である。

混合物を37°Cで30分間インキュベートしたが、反応温度は4°Cと低くてもよく、反応時間は1時間まで又はそれ以上延長し得る。インキュベーション後、12mgのT r i s 遊離塩基又はエタノールアミンを混合物に加えて、N H 3部分を抑制した。この抑制工程は省いてもよい。

20mM T r i s (pH 7. 4)、100mM N a C l 及び 0. 1% T w e e n で平

衡化させたPD-10カラム(G-25)(BioRad)を通して溶離して、反応混

合物を精製した。溶離液を0.5ml分画中に収集し、50%TCAで沈殿させることにより(マレイミド)z-P EG試薬の産生を検定した。次に、その結果生じた(マレイミド)z-P EG(Mal-P EG)試薬を用いて、PEGをシスティン残基(単数又は複数)に付着させることにより選定タンパク質を修飾した。

#### F. 4 (マレイミド)z-P EGとタンパク質との反応

タンパク質を(マレイミド)z-P EG試薬と反応させる前に、精製タンパク質(例えば位置99にシスティンを含有するPN-1突然変異体)を、DTT又はβMEを含有しない任意の適切な緩衝液中に約200μg/ml~1ng/mlの濃度に希釈した。普通は、緩衝液は20mMPIPES, pH6.75、0.6MNaCl及び1%グリセロールで構成された。約10μl~40μlの希釈タンパク質をPEG化反応に用いた。20mMTris(pH7.4)、0.1MNaCl及び0.01%Tweenから成る緩衝液10μl中に約1μlの(マレイミド)z-P EGを含有する溶液10μlずつを移入することにより、F.1項に記載の(マレイミド)z-P EG試薬を連続2倍希釈液中に希釈した。マレイミド-P EG対タンパク質の比は、所望のタンパク質の好みいレベルのPEG化によって変化し得る。

タンパク質及び(マレイミド)z-P EGを室温で1時間インキュベートしたが、この反応は4℃でより長い時間で実施してもよい。反応した混合物の試料を、SDS-PAGEにより分析して、完全カップリングに必要な最小量の(マレイミド)z-P EG試薬を確定し得る。

上記の反応を用いて、(マレイミド)z-P EG対タンパク質の適正比を確定し、次いで商業的に許容可能な量のPEG化タンパク質を产生するまで評価決定し得る。

#### 実施例G

##### システィン-PEG化PN-1の変異体(IV型変異体)の生成

###### G. 1: システィンとの置換のためのPN-1のアミノ酸残基Q選定

P N-1  $\alpha$  および P N-1  $\beta$  は、第 99 および 140 アミノ酸残基の位置に N-アセチルグルコサミン化部位を有する。したがって、これらの部位を、これらの位置の一方または双方のアスパラギンをシステインで置換する部位指向性変異誘発のため

に選択した。

P N-1 と相同的なタンパク質中の対応する部位でのグリコシル化された残基の存在に基づいて、P N-1 の 3 部位をシステインとの置換のために選んだ。アミノ酸残基 D 192 は、それぞれ P N-1 と相同であるアンギオテンシンおよび f R a b O R F 1 というタンパク質が、P N-1 のこの残基に対応するアミノ酸で N-アセチルグルコサミン化されていることから、システインとの置換に選んだ。アミノ酸残基 E 230 は、P N-1 と相同であるヒビの  $\alpha_1$ -抗トリプシン ( $\alpha_1$ -AT) が、P N-1 のこの残基に対応するアミノ酸でグリコシル化されていることから、システインとの置換に選んだ。アミノ酸残基 H 252 は、P N-1 と相同なもう一つのタンパク質である  $\alpha_2$ -抗プラスミン ( $\alpha_2$ -AP) が、対応する残基でグリコシル化されていることから、システインとの置換に選択した。

その他のアミノ酸残基は、X 線結晶学によって決定された限りでの P N-1 の三次元構造内でのアミノ酸の位置に基づいて（図 3）、システインとの置換に選んだ。システイン置換を選んだアミノ酸残基の近似的位置を、対応するそれらのアミノ酸残基番号で示す。本実施例での変異誘発のために同定された特定のアミノ酸残基は、アミノ酸の明らかな溶媒接近可能性、およびそのタンパク質中の他のアミノ酸との明らかに少ない相互作用に基づいて選択した。

#### G. 2 : P N-1 のシステインに対する部位指向性突然変異

D. 2 項に記載の部位指向性変異誘発を用いて、上記に選んだ突然変異を P N-1  $\alpha$  で発生させた。これらの実験には P N-1  $\alpha$  を用いたが、P N-1  $\beta$  における同じ突然変異は、これらのほとんど同一のタンパク質間でアミノ酸配列が同一である領域に、すべての突然変異を導入したのと同じ効果を与えるようである。略述すると、一本鎖 DNA の生成のための f l o r i を有するプラスミド p T 7 PN 1 に、P N-1 をコード化している DNA を挿入した。次いで、このプラスミドを、Kunkel の方法 [T.A. Kunkel (1988 年)、Nucleic Acids and Molecules]

ar Biology (F. Eckstein, D.M.J. Lilley編)、第2巻124ページ、Springer Verlag社、ドイツ国ベルリンおよびハイデルベルク]による部位指向性変異誘発の説明として用いる一本鎖DNAを生成するために、大腸菌CJ236株中で形質転換した。

P N-1のコード化領域内で特定の突然変異を発生させるのに用いたオリゴヌクレオチドは、下記のとおりである：

```

N140C AAT GCA TGG GTT AAA AAC GAA ACC AGG GAT
        AAT GCA TGG GTT AAC TGC GAA ACC AGG GAT
                    HpaI

N99C   GCC GTG TTT GTT AAG AAT GCC TCT GAA ATT
        GCC GTG TTT GTT AAC TGT GCC TCT GAA ATT
                    HpaI

P28C   GTG AAG TCG AGG CCT CAT GAC AAC ATC GTG ATC
        GTG AAG TCG AGG TGC CAT GAC AAC ATC GTG ATC

G52C   CTG GGG GCG GAC TGC AGG ACC AAG AAG
                    PstI

N85C   GTC TCC ARG AAG AAT AAA GAC ATT GTG ACA GTG GCT
        GTC TCC AAG AAG TGC AAA GAT ATC GTG ACA GTG GCT
                    EcoRV

Q116C AAA GAT GTG TTC CAG TGT GAG GTC CGG
        AAA GAT GTG TTC TGC AGT GAG GTC CGG
                    PstI

N304C TCA TCA AAG GCA AAT TTT GCA AAA ATA ACA
        TCA TCA AAG GCA TGC TTT GCA AAA ATA ACA
                    SphI

S1C    GAT ATA CAT ATG TCC CAC TTC AAT CCT CTG TGT CTC GAG
        GAT ATA CAT ATG TGC CAC TTC AAT CCC TTA AGT CTC GAG
                    AfII

GAA CTA CGC
GAA CTA CGC

R63C   AAG AAG CAG CTC GCC ATG GTG ATG AGA TAC GGC GTA AAT
        AAG AAG CAG CTC GCA ATG GTG ATG TGC TAC GGC GTA AAT
                    NcoI destroyed

E125C GTC CGG AAT GTG AAC TTT GAG GAT CCA GCC TCT
        GTC CGG AAT GTT AAC TTT TGC GAT CCA GCC TCT
                    HpaI

D147C AGG GAT ATG ATT GAC AAT CTG CTG TCC CCA GAT CTT ATT
        AGG GAT ATG ATT TGC AAT CTC TTA AGC CCA GAT CTT ATT
                    AfII

```

D192C TTC GTG GCA GCA GAC GGG AAA TCC TAT  
 TTC GTG GCA GCA TGC GGG AAA TCC TAT  
SphI

E230C CCC TAC CAC GGG GAA AGC ATC AGC ATG  
 CCC TAC CAC GGG TGC AGC ATC AGC ATG  
PstI

H252C GCC ATC ATC CCA CAC ATC AGC ACC AAG ACC ATA GAC  
 GCC ATC ATC CCA TGT ATC AGT ACT AAG ACC ATA GAC  
ScaI

S263C ACC ATA GAC AGC TGG ATG AGC ATG GTC  
 ACC ATA GAC AGT TGG ATG TGC ATC ATG GTC  
PvuII destroyed

P267C AGC ATC ATG GTC CCC AAG AGG GTG CAG  
 AGC ATC ATG GTC TGC AAA CGC GTG CAG  
Afl III

D284C GCT GTA GCA CAA ACA GAT TTG AAG GAG CCG CTG  
 GCT GTA GCA CAA ACA TGT TTA AAG GAG CCG CTG  
DraI

突然変異体は、未変性タンパク質中のアミノ酸残基に対する一文字コード、P N  
 - 1 のアミノ酸配列内でのそのアミノ酸の位置番号、およびその部位で置換され  
 たアミノ酸残基に対する一文字コードに従って命名される。例えば、突然変異体  
 S 1 C は、1 位のセリンがシステインで置換された P N - 1 タンパク質を生成す  
 る。上記突然変異体のそれについて、上の配列は野生型 P N - 1 の配列を示  
 すが、下の配列は、突然変異体のコーディング配列に導入された突然変異を示す  
 。太字のヌクレオチドは、野生型に対して変化している。二重下線を施したコド  
 ンは、システインのために新たに導入されたコドンである。突然変異させた D N  
 A 配列中の下線を施した配列は、突然変異体のヌクレオチド配列に導入されたか  
 、またはそれから削除された制限酵素部位を示す。これらの制限部位の導入また  
 は

削除は、その部位のコード化されているアミノ酸配列を変化させないが、P N -  
 1 コーディング配列へのオリゴヌクレオチド配列の組込みのために、部位指向性  
 変異誘発に付された D N A を有するクローナーをふるい分けする手段を提供する。  
 望みの突然変異の導入は、制限酵素分析によって確認した。  
 記載されたとおりの部位指向性変異誘発による第一の突然変異の導入によって

、多数のシステイン置換残基を有する突然変異体のP N-1タンパク質を生成した。制限酵素解析によって第一の突然変異の挿入を確認した後、異なるオリゴスクレオチドを用いて、D N Aを二回目の部位指向性変異誘発に付した。例えば、N 9 9 Cオリゴスクレオチドによる部位指向性変異誘発、およびコーディング配列での新たに導入されたH p a I部位の存在の確認によって、二重突然変異体であるN 9 9 C ; N 1 4 0 Cを生成した。次いで、N 9 9 C突然変異体のD N Aを、N 1 4 0 Cオリゴスクレオチドによる二回目の部位指向性変異誘発に付した。下記の表G. 5 Aには、これらの手法、および上記のオリゴスクレオチドを用いて生成した単一、二重および三重突然変異体を列挙している。

D. 3項に記載したとおりに、突然変異体のP N-1タンパク質をコード化しているD N Aを発現させ、発現したタンパク質を精製した。

G. 3 : P N-1 および P N-1 突然変異体とマレイミド-P E G試薬との反応  
上記のP N-1 および P N-1 突然変異体を精製した後、F. 2の全体プロトコルに従って、P. 1に記載したマレイミド-P E G試薬と各タンパク質とを反応させた。例えば、下記のプロトコルを用いて、突然変異体N 9 9 C ; N 1 4 0 Cをシステイン-P E G化した。

精製したN 9 9 C ; N 1 4 0 Cタンパク質は、pH 6. 7 5の20ミリモルP I P E S、0. 6モルN a C l、1%グリセリン中で約200 μg/mlの濃度に希釈した。希釈したタンパク質約40 μl(0. 25ナノモル)をP E G化反応に用いた。F. 1項に記載したマレイミド-P E G試薬を、pH 7. 4の20ミリモルのトリス、0. 1モルN a C lおよび0. 01%Tweenで構成される10 μlの体積の緩衝液へのマレイミド-P E G約2 μlから開始して、10 μlの移転を用いる一連の2倍希釈で希釈した。この反応は、P N-1のシステイン部位の数のP E G化に必要とされるより2倍過剰なマレイミド-P E G試薬を含有した。

N 9 9 C ; N 1 4 0 Cタンパク質とマレイミド-P E Gの混合物を、室温で1時間インキュベートした。反応した混合物のそれぞれの試料を、S D S-P A G Eによって分析した。このゲルの分析は、未修飾N 9 9 C ; N 1 4 0 CのP N-1の相対分子量で移動する帯域は、タンパク質に対するマレイミド-P E Gの比

率が増加するにつれて消滅することを明らかにした。したがって、試料中の未修飾N99C; N140CのPN-1の量が、マレイミド-PEGの濃度の上昇とともに消滅するにつれて、約5,000MWの増大する間隔を有する分子量で移動する独自の帯域が出現した。こうして、PN-1の変異体の反応は、N99C; N140CのPN-1の変異体で利用できるシステインの最大数である、PN-1の1分子あたり2PEG単位まで増大する数のタンパク質1分子あたりのPEG単位を有する、独自のシステイン-PEG化タンパク質を生成した。

相対分子量が5,000MWの間隔で増大するタンパク質を表す独自の帯域は、システイン残基へのPEGの結合に対するマレイミド-PEG反応の特異性の証拠である。この反応が、システイン以外の残基のPEG化を招いたのであれば、タンパク質のスマアがゲル上に出現して、不定数のPEG部分を含むタンパク質の存在を示したであろう。

D. 4に記載した検定法を用いて、2:1というマレイミド-PEG試薬対タンパク質の比率で反応させたシステイン-PEG化タンパク質の試料を、活性について試験した。この試料は、システイン-PEG化タンパク質を主として含有し、未修飾PN-1の少なくとも100%の活性を保有した。このPEG化タンパク質の比活性は、反応混合物中に存在するマレイミド-PEG試薬の量の増加とともに上昇した(図4)。これらのデータは、活性の上昇は、PEG修飾の増大の際に見出されることが多く、それは、PEG化PN-1の溶解度および/または活性の上昇の結果として生じ得ることを示唆する。

#### G. 4:慣用の方法を用いたPEG化PN-1の突然変異体の生成(比較例)

上記で得られた結果を当技術に公知のPEG化法と比較するために、米国特許第5,122,614号明細書でZalipskyが記載したのと類似の方法を用い、活性化炭酸エチルとしてZalipskyが用いたPEGのN-スクシンイミド炭酸エチルを、PEGのバラニトロフェノール炭酸エチルに置き換えて、N99C; N140

0

CのPN-1の変異体をPEG化した。用いたプロトコルは、それ以外は同一である。反応には、1:1~100:1の範囲の活性化PEG対PN-1突然変異

体 (N 99 C ; N 140 C) の比率を用いた。

PEG化試薬の希釀物を含有する反応させた混合物のそれぞれの試料を、SDS-PAGEによって分析した。このゲルの分析は、未修飾のPN-1の変異体の分子量で移動するタンパク質の量は、反応に用いたZalipskyのPEG試薬の濃度の上昇とともに減少することを明らかにした。しかし、本発明の方法を用いて形成された独自の帯域とは対照的に、未修飾タンパク質が消滅するにつれて、様々な、増加する分子量のタンパク質のスマアが出現した。慣用の方法で生成されたPEG化タンパク質は、タンパク質1分子あたり様々な数のPEG部分を含んでいて、PEGの付着が無秩序であり、また様々な位臵に対してもかかる数のリジン残基も修飾されたことを示唆する。

D. 4に記載した検定法で、様々なレベルのPEG修飾を有する試料を、活性について試験した。データは、マレイミド-PEG/タンパク質の反応混合物中に存在するマレイミド-PEG試薬の量が増加するにつれて、タンパク質の比活性が低下することを示す(図4)。このことは、慣用の方法を用いたPEG修飾のレベルの上昇は、タンパク質の活性の低下を招くことを示唆する。

G. 5:システィン-PEG化されたPN-1およびPN-1の突然変異体の活性

形成された特定のPN-1の突然変異体、およびシスティン-PEG化された突然変異体を表G. 5 Aに示す。PN-1の部位指向性突然変異体タンパク質のそれれとともに野生型PN-1も、F. 2に記載したプロトコルを用いたシスティン-PEG化によって修飾した。D. 4に記載した検定法を用いて、野生型PN-1、PN-1の部位指向性突然変異体のそれぞれ、ならびにシスティン-PEG化された野生型および突然変異体のタンパク質の活性を決定した。

表G、5A

突然変異体	PEG修飾前		PEG修飾後		
	比活性 <sup>1</sup>	野生型に対する相対活性 <sup>2</sup>	活性	PEG以前の活性に対する相対活性 <sup>3</sup>	野生型に対する相対活性 <sup>4</sup>
野生型	0.50	1	0.017	0.03	
N99C	0.20	0.40	0.50	2.5	1.0
N140C	0.050	0.10	0.10	2	0.20
N99C; N140C	0.167	.33	0.33	2	0.75
S1C <sup>5</sup>	0.10	0.20	0.25	2.5	0.50
R63C <sup>5</sup>	0.050	0.10	0.125	2.5	0.25
N85C <sup>5</sup>	0.033	0.066	0.040	1.2	0.080
D147C <sup>5</sup>	0.063	0.125	0.125	2	0.25
D192C <sup>5</sup>	0.045	0.091	0.91	2	0.18
E230C <sup>5</sup>	0.071	.14	0.20	2.8	0.40
H252C <sup>5</sup>	0.10	0.20	0.25	2.5	0.50
H252C <sup>5</sup>	0.10	0.20	0.25	2.5	0.50
N304C <sup>5</sup>	0.056	0.11	0.17	3	0.33
C117S; C131S; C209S	0.050		0.50		

1. 比活性は、PN-1（変異形）1 μgあたりの阻害されたトロンビンのNIH単位である。

2. 野生型に対する相対活性は、野生型PN-1の活性を突然変異体の活性で除して算出する。

3. PEG化以前のこのタンパク質の活性に対するシステイン-PEG化したタンパク質の相対活性は、PEG化以前の突然変異体の活性をPEG化以後の突然変異体の活性で除して算出する。

4. システイン-PEG化したPN-1の活性は、天然に産するCys209の修飾が活性を阻害するため、可変的である。

5. これらの突然変異体は、N99C; N140C突然変異体を背景としている（すなわち、これらは三重突然変異体である）。

PN-1についてここに記載した突然変異は、いかなるセルビン（serpin）に

も導入でき、セルビンタンパク質族の成員間の相同性に起因して、実質的に類似

の効果が期待される。

G. 6 : システインーPEG化されたPN-1およびPN-1の突然変異体の半減期に関する試験

いかなるタンパク質の循環半減期も、当技術に周知の標準的方法を用いて測定することができる。例えば、PEGで修飾した放射性タンパク質をマウス、ラットまたはウサギに注射する。様々な時間に血液を採取し、循環中に残留するタンパク質の量を、シンチレーション計数法によって決定する。これに代えて、PEGで修飾したPN-1をマウス、ラットまたはウサギに注射する。様々な時間に血液を採取し、ウロキナーゼ阻害活性を測定する。ある場合には、循環中に残留するタンパク質の量は、ELISAまたはサンドイッチELISAにおけるような抗体反応を用いて測定できる。

G. 7 : システインーPEG5PN-1の投与

上記のシステインーPEG化PN-1および/またはシステインーPEG化PN-1突然変異体は、PN-1が治療上役立つとして指示される各種の疾患状態の治療に用いてよい。例えば、これらのタンパク質は、米国特許第5,196,196号明細書に記載のとおり、傷口を手当てするための包帯に組み込んでよく、該特許は、傷口の手当て材料にPN-1を用いること（例えば、投与の量および経路）に関して、参照によって本明細書に組み込まれる。これに代えて、システインーPEG化PN-1および/またはシステインーPEG化PN-1突然変異体を、米国特許第5,206,017号および第5,326,562号明細書に記載のとおり、炎症および関節炎の治療のための薬剤学的組成物に活性成分として組み込んでもよく、該特許は、そのような状態の治療にPN-1を用いること（例えば、投与の量および経路）に関して、それぞれ参照によって本明細書に組み込まれる。

実施例H

システインーPEG化エリトロポイエチン(EPO)の生成

H. 1 : システイン置換のためのアミノ酸残基の選定

エリトロポイエチン(EPO)のアミノ酸配列は下記のとおりである：

```

MGVHECPAWLWLLSLLSLPLGLPVLGAPPRLICDSRVLQRYLLEAKEAE 50
MTTGCAEHCSLNEMITVPDTKVNFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEA 100
VLRGQALLVMSQGPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLLRALGAQKEAISPPD 150
AASAAPLRTTADTFRKLFRVYSNPLRGKLKLYTGEACRTGDR 194

```

このタンパク質の最初の27アミノ酸(イタリック体で示す)は、EPOのシグナル配列である。上記に太字で示し、かつ下線を施したアミノ酸残基(N24、N38およびN83)は、未変性EPOタンパク質のN-アセチル化の部位である。そのため、これらの部位をシステイン残基との置換に選び、その後、PEG化によって修飾する。

#### H.2:EPOの部位指向性変異誘発

成熟EPOタンパク質についてコード化している完全なヌクレオチド配列は、当技術において公知であり、GenBankから入手可能である。D.2に記載のとおり、成熟EPOタンパク質をコード化しているDNAをクローニングし、部位指向性変異誘発に付す。システインとの残基N24、N38およびN83の置換のためのオリゴヌクレオチドは、下記のとおりである：

```

N24C: GCC AAG GAG GCC GAG TGT ATC ACG ACG GGC
N38C: TGC AGC TTG AAT GAG TGT ATC ACT GTC CCA
N83C: GCC CTG TTG GTC TGC TCT TCC CAG CCG

```

太字で示し、かつ下線を施した残基は、野生型EPOのDNA配列に対して異なり、かつEPOのアミノ酸配列に導入しようとするシステインのコドンを表すヌクレオチドを示す。

N24、N38、N83、またはこれらの部位の組合せ(例えば二重および三重突然変異体)にシステイン残基を有する突然変異体EPOタンパク質を、当技術に周知の手法を用いて、記載のとおり生成、発現、かつ精製する。

#### H.3:システイン-PEG化EPO、およびシステイン-PEG化EPO突然変異体の生成

F.2に記載したプロトコルを用いて、精製したEPOの突然変異体であるN24C、N38C、N83C、およびこれらの突然変異の組合せを有する突然変異体をシステイン-PEG化に付す。反応させたタンパク質の試料を SDS-P

A G Eで分析して、P E G化の程度はもとより、完全にP E G化されたタンパク質を生成するのに必要なマレイミドーP E G試薬の最小量も決定する。

当技術に公知のプロトコルを用いて、システインーP E G化された野生型E P Oはもとより、システインーP E G化されたE P O突然変異体の活性も試験する。

### 実施例I

#### システインーP E G化ヒト成長ホルモン(h G H)の生成

##### I. 1 : システイン置換のためのアミノ酸残基の選定

ヒト成長ホルモン(h G H)のスクレオチド配列、アミノ酸配列および三次元構造は、当技術に周知である【例えば、Cunningham およびWells(1989年)、Science、第244巻1,081~1,085ページを参照されたい】。その上、その受容体に結合したh G Hの三次元構造も公知である【De Vosら(1992年)、Science、第255巻306~312ページ】。システインとの置換のためのアミノ酸残基は、アミノ酸残基の溶媒接近可能性、アミノ酸残基がそれと作用し合える他のアミノ酸残基に近接していること、および受容体との結合に重要なことが公知であるh G Hの領域からの残基の距離に基づいて選ぶ【Cunningham およびWells(1989年)、Science、第244巻1,081~1,085ページ】。

##### I. 2 : h G Hの部位指向性変異誘発

上記で選んだアミノ酸残基の場所にシステイン残基を導入するように、部位指

向性変異誘発のためのオリゴスクレオチドを設計する。部位指向性変異誘発は、D. 2に記載のとおりに実施する。次いで、得られたh G HのD N Aを発現ベクターに挿入し、得られたタンパク質を大腸菌または他の適切な宿主で発現させる。次いで、得られたh G H突然変異体のタンパク質を、当技術に公知の方法に従って精製する。

##### I. 3 : システインーP E G 5 h G H化の生成

次いで、F. 2に概説した方法を用いて、h G Hの突然変異体タンパク質をシステインーP E G化に付す。マレイミドーP E Gとh G Hの突然変異体タンパク質とを反応させた混合物の試料を、S D S-P A G Eで分析して、システインー

P E G化の最適条件（例えば、望みのP E G化されたh G Hの突然変異体タンパク質を与えるのに必要なマレイミド—P E G試薬の最小量）を決定する。

次いで、CunninghamおよびWells〔前出〕に記載のとおり、修飾されたタンパク質が、断端されたh G Hの精製された受容体に結合できる能力について検定することによって、システインーP E G化h G Hタンパク質を活性について試験する。

#### 実施例1

##### システインーP E G化架橋結合によるヘモグロビンの生成

ヘモグロビンは、2本の「a」鎖と2本の「b」鎖とで構成される四量体タンパク質複合体である。ヘモグロビンの「a」および「b」鎖はもとより、2「a」および2「b」鎖で構成されるヘモグロビンの四量体複合体のアミノ酸配列も周知である。溶媒接近可能であり、かつ他の側鎖と最小限に接触している適切なアミノ酸残基を、システインに対する部位指向性変異誘発のために選ぶ。次いで、「a」および「b」鎖の突然変異体を発現させ、精製し、そして四量体を形成させる。次いで、上記F、4に記載のとおり、この突然変異体四量体複合体を様々なレベルの（マレイミド） $-$ P E G試薬と反応させる。この反応は、非常に希薄なヘモグロビンレベルで実施して、最小数の分子間架橋結合で四量体形態のヘモグロビンを安定化するための分子間架橋結合を形成することができる。これに代えて、より高いヘモグロビン濃度で反応を実施して、ヘモグロビン分子の凝集体を安定化するための、より高レベルの分子間架橋結合を招くこともできる。

本発明は、特定のプロテアーゼネキシン-1の変異体、およびそのようなものを含む配合物を参照して説明してきたが、本発明の真の精神および範囲から逸脱することなしに、様々な変更を実施してよく、かつ等価のものに置き換えてよいことが、当業者によって理解されなければならない。その上、本発明の特定の状況、材料、補形薬、P N-1変異体、工程、目的に至る単数または複数の工程段階、精神および範囲に適合させるように、多くの変更を施してよい。そのような変更はすべて、これに付記された請求の範囲内にあるものとする。

### 【图 1】

## プロテアーゼネキシン1αの配列

四一

### 【図 1】

四一

【図2】

プロテアーゼネキシン1 $\beta$ の配列

圖 2 - 1

【図2】

【図3】

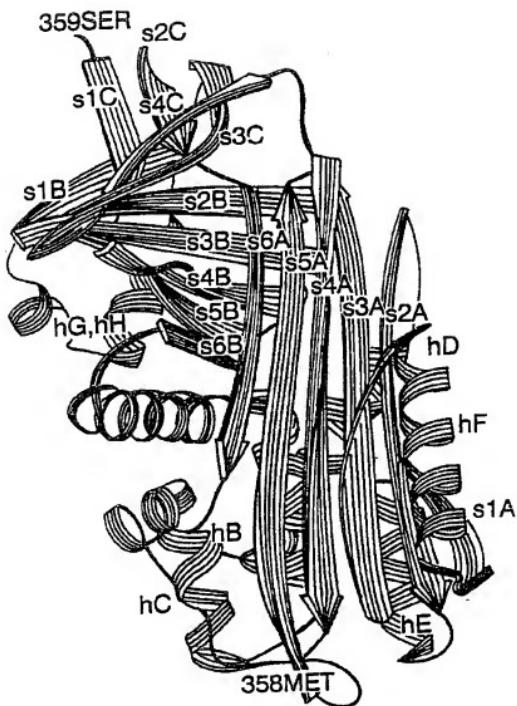


図 3

【図4】

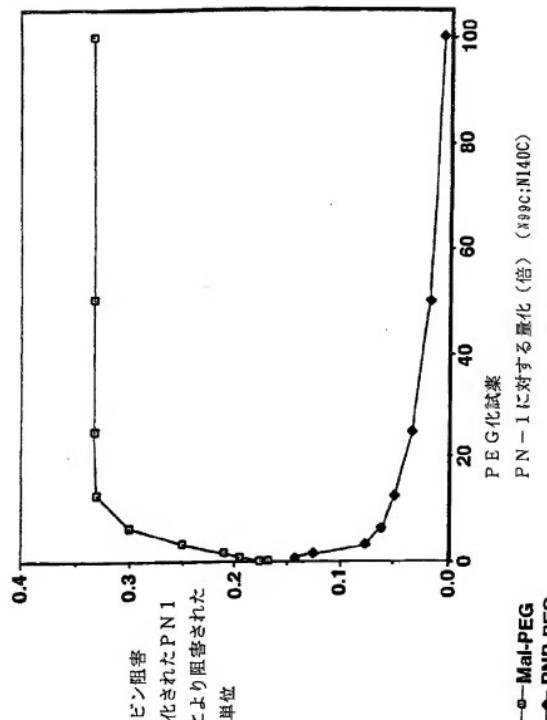


図4

## 【国际調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US94/11624

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
IPC(6) : C12P 21/06; C12N 15/00, 9/86; A61K 38/00 US CL : 435/69.2, 69.7, 172.1, 188; 530/345 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) <b>U.S.</b> : 435/69.2, 69.7, 172.1, 188; 530/345		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US, A, 5,166,322 (SHAW ET AL.) 24 November 1992, see entire document.	1-53
Y	US, A, 5,206,344 (KATRE ET AL.) 27 April 1993, see entire document.	1-53
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"B" earlier document published on or after the international filing date which may throw doubt on priority claimed or which is cited to establish the publication date of another citation or other relevant document (see notes)</p> <p>"C" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"D" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"E" later document published after the international filing date or priority date which may throw doubt on priority claimed or which is cited to establish the principle or theory underlying the invention</p> <p>"F" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"G" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken into account together with one or more other such documents, and continuation being relevant to a person skilled in the art</p> <p>"H" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search <b>09 FEBRUARY 1995</b>	Date of mailing of the international search report <b>17 FEB 1995</b>	
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230	Authorized officer <b>MINDY B. FLEISCHER</b> Telephone No. (703) 308-0196	

フロントページの続き

(51) Int.CI. <sup>5</sup>	識別記号	序内整理番号	F I	
C 0 7 K 19/00	9162-4B	C 1 2 N 15/00		A
C 1 2 N 9/96	9051-4C	A 6 1 K 37/64	A B E	
9/99	9051-4C	37/54	A D U	
15/09	9051-4C	37/02	A C B	
//(C 1 2 P 21/02				
C 1 2 R 1:19)				

(81) 指定国	E P (A T, B E, C H, D E,
D K, E S, F R, G B, G R, I E, I T, L U, M	
C, N L, P T, S E), A M, A T, A U, B B, B	
G, B R, B Y, C A, C H, C N, C Z, D E, D K	
, E S, F I, G B, G E, H U, J P, K E, K G,	
K P, K R, K Z, L K, L T, L U, L V, M D, M	
G, M N, M W, N L, N O, N Z, P L, P T, R O	
, R U, S D, S E, S I, S K, T J, T T, U A,	
U S, U Z, V N	